

JBSE

JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF
Ecotoxicology

VOLUME 1, NUMBER 1, 2006

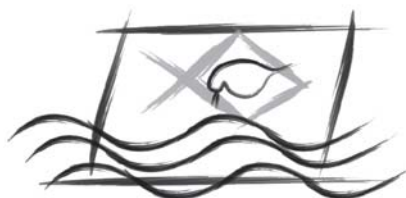
EDITORS

Evaldo Luiz Gaeta Espíndola
University of São Paulo
Brazil

Gilberto Fillmann (Editor-in-Chief)
University Foundation of Rio Grande
Brazil

José Maria Monserrat
University Foundation of Rio Grande
Brazil

Maria Beatriz C. Bohrer-Morel
IPEN-CNEN/SP
Brazil



SETAC – Brazil

A quarterly publication of the Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC Brazil)

EDITORS

Evaldo Luiz Gaeta Espíndola
University of São Paulo
Brazil

Gilberto Fillmann (Editor-in-Chief)
University Foundation of Rio Grande
Brazil

José Maria Monserrat
University Foundation of Rio Grande
Brazil

Maria Beatriz C. Bohrer-Morel
IPEN-CNEN/SP
Brazil

EDITORIAL BOARD
(PROVISIONAL)

Dr. Francesco Regoli
University of Ancona
Italy

Dr Juan López-Barea
University of Córdoba
Spain

Dr Ricardo Barra
University of Concepcion
Chile

Dr G. Allen Burton
Wright State University
USA

Dr Maria João Bebianno
University of Algarve
Portugal

Dr Richard J. Wenning
ENVIRON International
Corporation
USA

Dr. James W. Readman
Plymouth Marine Laboratory
England

Dr Paule Vasseur
University of Metz
France

Dr Rui Ribeiro
University of Coimbra
Portugal

BRAZILIAN SOCIETY OF ECOTOXICOLOGY (2004-2006)

President: Adalto Bianchini (FURG)
1^o Vice-President: Evaldo G. Espíndola (USC)
2^o Vice-President: Afonso C.D. Bainy (UFSC)
1^o Director: Sueli Borrelly (IPEN)
2^o Director: Alexandre Arenzon (UFRGS)
1^o Secretary: Vera Vargas (FEPAM)
2^o Secretary: Edvinety Ceci de Souza (USP)
1^o Treasurer: Gilberto Fillmann (FURG)
2^o Treasurer: Fabio Berto X. da Silva (Tribel)

Permanent Financial Board

Eduardo Bertolletti (CETESB)
Cintia Badaró-Pedroso (UNIMONTE)
Eduardo Platte (PETROBRÀS)

Substitute Financial Board

Paulo S. M. Carvalho (CETESB)
Anne Leonor Vieira (FATMA)
Regina Sawaia Sáfaci (TECAM)

**SPECIAL ISSUE ON THE VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA
(VIII ECOTOX, 17-20 October 2004, Florianópolis, SC, Brazil)**

EDITORIAL

It is with great satisfaction that the Editorial Board publishes papers presented at the VIII *Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia* (Brazilian Conference of Ecotoxicology) – ECOTOX, which took place at Praiatur Hotel, Ingleses Beach, Florianópolis (SC, Brazil), between October 17th and 20th, 2004.

The ECOTOX Conference has been serving as a forum for presentation and discussion of several aspects related to ecotoxicology studied by the Brazilian scientific community. An increase in the diversity of the related subjects presented in the conference was observed throughout the years, and several of them are published in this special issue.

The publication of these papers represents a very precious moment to our Society, since fulfills an objective aimed for a long time. In addition, this publication is even more special because these selected papers put together the first two issues of the journal of our Society.

The Editorial Board, together with the Conference Scientific Board, believes to have reached its aim and thank all authors for their contributions.

Editorial Board of the VIII ECOTOX

EDITORIAL

É com grande satisfação que a Comissão Editorial publica trabalhos apresentados no VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – ECOTOX, o qual foi realizado no Praiatur Hotel, Praia dos Ingleses, Florianópolis (SC, Brasil), no período de 17 a 20 de Outubro de 2004.

O ECOTOX tem sido o fórum para apresentação e discussão de temas que vem sendo estudados pela comunidade científica brasileira no âmbito da Ecotoxicologia. Ao longo dos anos, foi possível observar um incremento na diversidade dos assuntos apresentados nos congressos ECOTOX, muitos dos quais estão publicados nesta edição especial.

Acreditamos que a publicação destes trabalhos representa um momento muito importante para a nossa Sociedade, pois concretiza um objetivo estabelecido há muito tempo. Além disso, esta publicação representa um marco especial, pois os trabalhos aqui apresentados fazem parte dos dois primeiros volumes da revista da nossa Sociedade.

A Comissão Editorial, juntamente com a Comissão Científica do Evento, espera ter cumprido sua missão e agradece a contribuição de todos os autores.

Comissão Editorial do VIII ECOTOX

CONFERENCE ORGANIZING COMMITTEE (2003-2004)

Afonso Celso Dias Bainy (UFSC) – bainy@mbox1.ufsc.br
Anne Leonor Vieira (FATMA) – annelv@ig.com.br
Alcir Luiz Dafré (UFSC) - aldafre@ccb.ufsc.br
Maria Risoleta Freire Marques (UFSC)- risomar@mbox1.ufsc.br
Paulo Sérgio Martins de Carvalho (UFSC) – pcarvalho@ccb.ufsc.br

EDITORIAL BOARD OF THE SPECIAL ISSUE

Abílio de Oliveira Neto
State University of Campinas
Brazil

Maria Beatriz C. Bohrer-Morel
(President)
IPEN-CNEN/SP
Brazil

Edvinety C.P.M. de Sousa
University of São Paulo
Brazil

Regina Sawaia Sáfadi
TECAM
Brazil

SCIENTIFIC BOARD OF THE SPECIAL ISSUE

Alexandre Arenzon UFRGS - Brazil	Fábio B. Xavier da Silva TRIBEL - Brazil	Pedro Zagatto BIAGRI - Brazil
Charrid Resgalla Júnior UNIVALI - Brazil	Helena Cristina S. Assis UFPR - Brazil	Regina Sáfadi TECAM - Brazil
Dênis Moledo S. Abessa UNESP - Brazil	José M. Monserrat FURG - Brazil	Roberta A.V.C. Jorge USP - Brazil
Edvinety C.P.M. Sousa USP - Brazil	Leonardo Rubi Rörig UNIVALI - Brazil	Tuiskon Dick UFRGS - Brazil
Eduardo Bertoletti CETESB - Brazil	Maria B. Bohrer-Morel IPEN/USP - Brazil	Vera Maria F. Vargas FEPAM - Brazil
Eduardo Mendes da Silva UFBA - Brazil	Maria T.R. Rodriguez UFRGS - Brazil	

Secretary: Angélica M. da Silva (IPEN-CNEN/SP – Brazil) / Acknowledgement: Roberta A.V.C. Jorge (USP – Brazil)

CONTENTS

Volume 1

June, 2006

Number 1

This Special Issue contains paper presented at the VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - ECOTOX (Brazilian Conference of Ecotoxicology), Florianópolis, SC, Brazil, 17-20 October 2004,

Evaluation of Genotoxicity and Toxicity of Buenos Aires City Hospital Wastewater Samples	1
M. Paz, H. Muzio, A. Mendelson, A. Magdaleno, C. Tornello, N. Balbis & J. Moretton	
Influência do Manganês em Ensaios de Toxicidade com Algas em Amostras Ambientais	7
A. Arenzon & M. T. Raya-Rodriguez	
Comportamento de <i>Cubaris murina</i> Brandt (Crustacea: Isopoda) em Solo com Glifosato: Testes de Fuga em Laboratório ...	13
J. C. Niemeyer, V. C. dos Santos, J. M. L. Rodrigues & E. M. da-Silva	
Efeitos na Biomassa de <i>Cubaris murina</i> Brandt (Crustacea: Isopoda) Expostos ao Solo com Glifosato em Laboratório	17
J. C. Niemeyer, D. Vilaça & E. M. da-Silva	
Selênio em Tecidos de Organismos Marinhos da Baía de Guanabara, Brasil	21
T. G. Seixas, H. A. Kehrig, I. Moreira & O. Malm	
Estudo de Alterações na Concentração dos Íons Plasmáticos e da Indução de Micronúcleos em	
<i>Piaractus mesopotamicus</i> Exposto ao Herbicida Atrazina	27
S. E. Moron, V. L. P. Polez, R. F. Artoni, J. L. C. Ribas & H. K. Takahashi	
N. 6 Fuel Oil Effects on Antioxidant Enzymes and Immunological Responses in the Fish	
<i>Thalassophryne maculosa</i> (Pisces: Batrochoididae)	31
L. Marcano, O. Nusetti, E. Zapata-Vívenes, S. Nusetti & M. M. Esclapés	
Sensibilidade a Cobre e Cromo por <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>Pistia stratiotes</i>	37
M. B. Masutti, E. L. G. Espíndola, A. de M. Nogueira & F. C. F. Simões	
Testes de Toxicidade com <i>Daphnia magna</i>: Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB	43
K. dos Santos Laitano & W. G. Matias	
Utilização de Testes de Toxicidade com Embriões da Ostra <i>Crassostrea rhizophorae</i> (Guilding, 1828) para Avaliação da	
Eficiência de uma Estação de Tratamento de Esgotos de Vitória (ES)	49
R. A. Magris, F. Passamani, F. P. Binda & L. Loureiro Fernandes	
Comparação dos Efeitos do Material Particulado em Suspensão (PTS) Colhido em Diferentes Fontes Emissoras	
de Poluentes sobre a Embriogênese em Ovos de Galinha	53
D. C. Azevedo, D. S. Oliveira, H. M. B. Guimarães, R. S. L. Martins, M. Macchiore & P. H. N. Saldiva	
Mutagenicidade do Sedimento e Estresse Oxidativo Hepático em Peixes sob a Influência de Curtumes	57
K. C. Tagliari, R. Cecchini, J. A. Vaz Rocha & V. M. F. Vargas	
Toxicidade de Resíduos Têxteis Tratados por Microrganismos	63
P. M. Dellamatrice & R. T. R. Monteiro	
Utilização de Planárias da Espécie <i>Dugesia</i> (<i>Girardia</i>) <i>tigrina</i> em Testes de Toxicidade de	
Efluente de Refinaria de Petróleo	67
G. S. Barros, D. F. Angelis, L. T. Furlan & B. Corrêa-Junior	
Influência do Fenarimol no Desenvolvimento Animal e Reprodução em Ratos	71
V. Castro, S. Scramin & M. Melo	
Hydrothermal Vents as a Possible Natural Pollution Laboratory: Metal Detoxification Mechanisms in	
Mussels and Fishes from Lucky Strike	75
R. Company, A. Serafim, H. Felícia, R. Cosson, A. Fiala-Médioni & M. J. Bebianno	
Ação de Detergente Doméstico na Biologia Reprodutiva do Camarão de Água Doce <i>Macrobrachium olfersi</i>	79
L. C. Martins, R. D. da Rosa, L. D. Rivero, E. M. Nazari & Y. M. R. Müller	
Ação do Acetato de Chumbo sobre o Padrão de Desenvolvimento de Embriões de <i>Gallus domesticus</i>	83
L. B. D. Rivero, J. C. Schatz, M. S. L. Carvalho, M. C. de Carvalho & Y. M. Rauh Müller	
Atividade de Acetilcolinesterase em <i>Daphnia</i>: Um Bom Biomarcador de Avaliação Ambiental?	89
L. B. Printes & A. Callaghan	
Effects of the <i>Microcystis aeruginosa</i> Strain RST9501 from Patos Lagoon, RS, on Growth and Reproduction of the	
Cladocera <i>Ceriodaphnia dubia</i>	93
N. J. C. Monteiro, J. S. Yunes & M. B. Bohrer-Morel	



SETAC – Brazil

Evaluation of Genotoxicity and Toxicity of Buenos Aires City Hospital Wastewater Samples

M. PAZ, H. MUZIO, A. MENDELSON, A. MAGDALENO, C. TORNELLO, N. BALBIS & J. MORETTON*

Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires

ABSTRACT

The untreated wastewaters from health centers present a potential risk aquatic ecosystems because of the content of toxic and genotoxic chemicals. The composition of these wastewaters discharged to the urban sewer system present fluctuations generated by spatial and temporal variations in the discharges of cytostatics, heavy metals (Pb, Cr, Hg), antibiotics, etc. In Buenos Aires city the Hospital effluents are discharged to the sewer system with no previous treatment in turn the wastes of the municipal sewage system are released to the Río de la Plata, at a rate of 1,900 m³/day, with no treatment at all. This river is also the source of water for the plants that provide drinking water to the city. The objective of this paper was the study of the genotoxicity and toxicity from Hospital San Martín wastewaters. This General Hospital releases approximately 560 m³ daily of effluents to the municipal sewer system, from. Sampling this effluent was performed seasonally, in this paper we report the results obtained in summer 2003, autumn 2004 samples. The determination of toxicity was performed with the *Pseudomonas fluorescens* growth inhibition test and with the determination of mitotic index in *Allium* root tips. On the other hand the genotoxicity was studied with *Saccharomyces cerevisiae* D7 assay and with the induction of chromosomal aberrations in *Allium cepa* test. Each sample was assayed either after sterilization by filtration or as an XAD-2 resins extract. The samples of summer 2003 were toxic and genotoxic in the *Allium* test when were assayed at 100% and 50% v/v dilutions, genotoxicity in the *Saccharomyces cerevisiae* test was also detected at 100% and 10% v/v dilutions. The samples of autumn 2004 were no genotoxic, only toxicity for *Saccharomyces* strain was detected when raw effluents and 100X extracts were tested. None of the wastewaters samples assayed demonstrated toxicity in the *Pseudomonas fluorescens* test.

Key words: toxicity, genotoxicity, hospital effluents.

RESUMO

Avaliação de genotoxicidade e toxicidade em efluentes de um Serviço de Saúde de Buenos Aires, Argentina

Os efluentes líquidos não tratados gerados em serviços de saúde representam um perigo potencial pela veiculação de substâncias químicas com efeitos tóxicos e genotóxicos sobre os organismos presentes nos ecossistemas aquáticos. Estes líquidos apresentam grande variação em sua constituição química, pois podem conter compostos químicos como metais pesados (Pb, Hg e Cr), antibióticos não biodegradáveis, entre outros. Na cidade de Buenos Aires, os hospitais lançam seus resíduos líquidos sem tratamento na rede coletora de esgotos, tendo como destino final, com um mínimo de tratamento, o rio de La Plata, principal fonte de abastecimento de água para uma população de 10 milhões de habitantes. Por isso, é importante estudar os riscos que os poluentes presentes nos efluentes podem representar para o meio ambiente. Este trabalho teve por objetivo analisar a toxicidade e genotoxicidade em resíduos líquidos do Hospital de Clínicas da Universidad de Buenos Aires, serviço de saúde geral de grande porte que lança um volume total diário de 564 m³ de esgoto. As coletas do efluente foram feitas no verão e no outono. As análises de toxicidade e genotoxicidade foram realizadas no efluente utilizando diferentes sistemas biológicos normatizados: ensaio de inibição do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* e os testes de genotoxicidade com *Saccharomyces cerevisiae* e *Allium cepa*. Os ensaios foram realizados com o efluente *in natura* e concentrado (100X) em resina trocadora de íons XAD-2. As amostras do efluente *in natura* coletadas no verão apresentaram toxicidade e genotoxicidade para *Allium cepa* (100% e 50% v/v) e genotoxicidade para *Saccharomyces*

* Corresponding author: Juan Moretton, e-mail: jamorett@ffyb.uba.ar

cerevisiae (100% e 10% v/v). Com relação às amostras coletadas no outono, foram consideradas tóxicas para o teste de *Saccharomyces cerevisiae* (100% v/v). As amostras concentradas 100X foram tóxicas para leveduras. Nenhuma das quatro amostras apresentou inibição do crescimento de *Pseudomonas fluorescens*.

Palavras-chave: toxicidade, genotoxicidade, efluente hospitalar.

INTRODUCTION

Hospitals consume daily an important volume of water. Indeed domestic water use in developed countries is, on average, 100 liters/person/day (Gadelle, 1995), while the value generally admitted for hospitals varies from 400 to 1,200 liters/bed/day (Deloffre-Bonnamour, 1995). This important amount of water produces in turn a significant volume of wastewater loaded with micro-organisms, heavy metals, toxic chemicals, and radioactive elements (Kümmerer, 2001). The hospital effluents are discharged, usually, in the urban sewer system where they mix with other effluents and finally reach the sewage treatment plant for purification. The last step of this process is the release of purified wastewaters to a river, a lake, to groundwater or to seawaters. Some of these water bodies are used also as a source of drinking water (Figure 1).

In hospitals a variety of substances are in use for medical purposes. Pharmaceuticals are composed by active substances,

formulation adjuvants and in some instances pigments and dyes. All these components, and its human metabolites, can reach the wastewaters (Halling-Sorensen, 1998; Stumpf *et al.*, 1999; Ternes, 1998). On the other hand unused pharmaceuticals and diagnostic agents are sometimes disposed of in drains. Some drugs like cytostatic agents are genotoxic (Bassi & Moreton, 2003; Ortolan, 1999).

The presence of heavy metals such as mercury and silver and chlorinated compounds were reported in hospital wastewater. Some disinfectants and preservatives contain mercury and chromium, platinum is the main component of a group of cytostatic agents (Kümmerer, 2001).

Organic matter can reach high concentrations in these effluents. COD values of 1,900 mg/L, with BOD₅ of 700 mg/L have been detected (Emmanuel *et al.*, 2001). In previous determinations in Buenos Aires city area hospital samples, lower values of COD and BOD were found (Paz *et al.*, 2004).

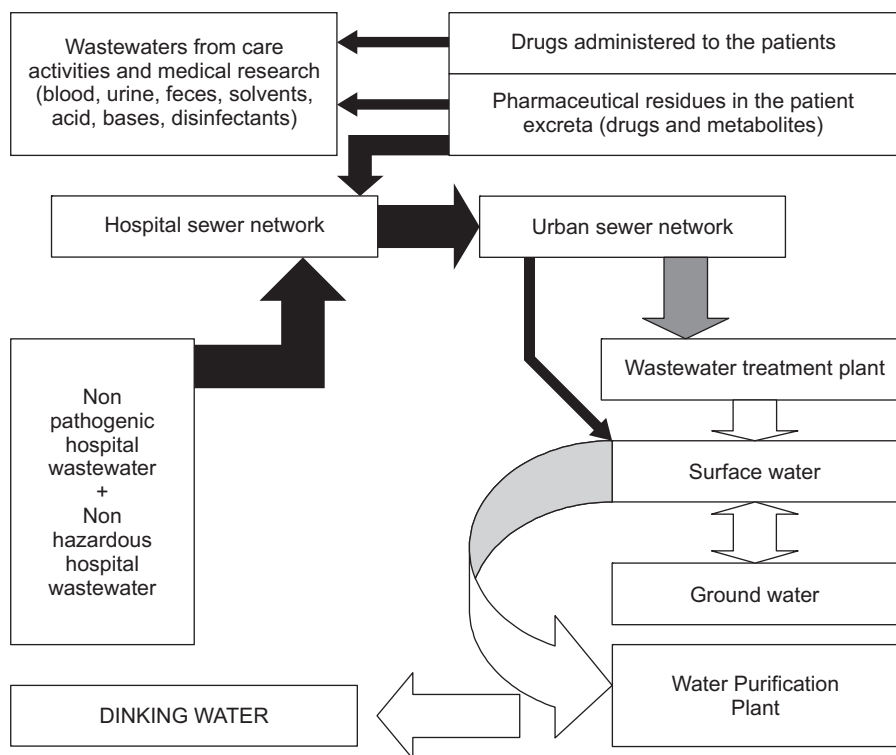


Figure 1 — Cycle of hospital wastewaters.

Iodated X-ray contrast media, solvents, disinfectants, cleaners and drugs containing chlorine are the major mass carriers for the AOX (adsorbable organic halogens) in hospital effluents (Kümmerer *et al.*, 1998). Concentrations of nearly 10 mg/L of AOX were detected in the effluents of a university hospital center (Gartiser *et al.*, 1996). The AOX are not easily biodegradable.

A mutagenic hazard can be manifested as a heritable change resulting from germ-line mutations and or somatic mutations leading to cancer or other chronic degenerative processes such as aging and coronary heart diseases. Although there are species differences in metabolism, DNA repair, and other physiological processes affecting chemical mutagenesis, the universality of DNA and genetic code provides rationale for using various non-human test systems to predict the intrinsic mutagenicity of test chemicals (Moreno-Abril & Carrillo-Gallego, 2002). Even when the genotoxicity of compounds like silver, cytostatic drugs, heavy metals, etc were widely studied, no data of the genotoxicity of the complex mixture generated in the hospital wastewater were reported in Argentina.

The aim of this paper is the toxicological and genotoxicological characterization of San Martín General Hospital wastewater samples obtained before their discharge in the urban sewage system. The San Martín General Hospital is a public health center that provides hospital care in a broad category of illness and injuries.

This Hospital operates with 400 licensed beds (maximum number of beds that the facility can operate) and approximately 300 set-up beds (number of actual beds that are in operation and available for patient use). The Hospital's Laboratory conducts test in the following areas: hematology, chemistry, urinalysis, microbiology, blood bank, pathology, and cytology, for both inpatient services as well as out patient services. The San Martín Hospital releases daily approximately 560 cubic meters of effluents to the urban sewer system (Anuario Estadístico 2001). In Argentina few, if any, characterization of hospital effluents were carried on. One of the main problems of the Buenos Aires city area is the lack of sewer treatment plant. The wastes of the urban sewage system are released to the Río de la Plata, at a rate of 1,900 millions of m³/day, with no treatment at all. This river is also the source of water for the plants that provide drinking water to the city.

MATERIAL AND METHODS

The source of test samples was wastewater obtained from the sewer test chamber, in a representative point located just before the release of the San Martín Hospital effluents to the urban sewer system. The composite samples were taken seasonally during summer and autumn 2003-2004. The sampling was performed during a period of 12 h taking a sample every

two hours. The same volume of each partial sample was mixed at the end of the day to obtain the composite sample submitted to biological test. The results reported in this paper correspond to two representative samples of December and April.

Each composite sample was assayed either after sterilization by filtration through a 0.22 µm pore-size cellulose nitrate filter (Millipore), or as an extract obtained as follows: 500 mL of water were filtered (Whatman microfibre paper) and then passed through a column (10 cm high × 1 cm diameter) of XAD-2 resins with a flow rate of 10 mL/min. Ethyl ether was used for the resins elution. Then the ether extracts were collected in beakers and brought to dryness by rotary evaporation at 37°C. Finally, the dried extracts were dissolved in 5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO), and assayed for genotoxicity (Moretton *et al.*, 1990; Moretton *et al.*, 1991). The final volumetric concentration factor was 100.

The *Pseudomonas fluorescens* growth inhibition test is based on evaluation of the effect of the test substances on the growth rate of an actively growing bacterial culture in a nutrient broth under defined conditions of temperature and time. The strain *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 was used as a test organism. The test was conducted in duplicates according to Kümmerer (2001). The wastewater samples were incubated with the bacteria suspension at 26°C during 18 h. After incubation the optical density at 650 nm was determined for the samples and controls. The dilution of the raw wastewater sample was plotted against optical density for the calculation of IC50, the effective dilution causing 50% reduction of OD or bacterial growth.

The diploid D7 strain in *Saccharomyces cerevisiae* (*MATa/MATα, ade2-40/ade2-119, trp5-12/trp5-2, ilv1-92/ilv1-92*) was obtained from Dr Giorgio Bronzetti (Laboratorio di Mutagenesi e Differenziamento, Pisa, Italy), and the assay was performed as previously described Moretton *et al.* (1990). Prior to each experiment the *S. cerevisiae* D7 strain was tested for the frequency of spontaneous revertants at the tryptophan (*trp*) locus. Cells of a stationary phase culture were treated with the samples and incubated 2 and 24 h at 28°C. After treatment washed cells suspensions were plated on appropriate media. For all the assays the data were analyzed using the modified 2-fold rule in which a response is considered positive if the average response for at least two consecutive dose levels was more than twice the spontaneous frequencies (Moretton *et al.*, 1990; Moretton *et al.*, 1991). All the samples were assayed, at least, over 3 log concentrations range up to the limit imposed by toxicity of the sample for the tester strains. The data obtained were subjected to an analysis of variance (Sokal & Rohlf, 1994) with computer assistance (STATISTICA 5.0).

For the *Allium* test equal-sized bulbs were chosen from a population of the common onion *Allium cepa*, and series of onions were grown in each test liquid. Prior to the test start,

the outer scales of the bulbs and the brownish bottom plate were removed. The onions were placed directly in the test liquid, that were changed regularly every day. Slides for microscopical studies were prepared after change of liquid in day 2, independent of root length. The roots were cut, suspended in Carnoy solution for 24 h and then conserved in ethanol 70%. The standard procedure for orcein staining of squash material was performed according the description of Fiskejö (1985). From each slide 100 mitosis were scored for detect genotoxic effects and the mitotic index were scored from 1,000 cells. The following days, macroscopic observations like root form and root length, were performed. As the distribution of chromosome aberrations is binomial, the χ^2 -test was used for statistical calculations (Sokal & Rohlf, 1994).

RESULTS AND DISCUSSION

The effects of hospital effluents on the growth inhibition of *P. fluorescens* are shown in Figure 2. In the broad rank of wastewater dilution assayed no significant variation in the optical density (OD) was detected, consequently it was not possible the calculation of EC_{50} values for the effluents samples. These results indicated that the effluents were no toxic in the *P. fluorescens* growth inhibition test. The dilution with tap water of heavy metals, phenols, disinfectants, etc. join to the presence of organic matter in the hospital sewer system, would generate an extremely low (below the sensitivity level of the *Pseudomonas* growth inhibition test) concentration of toxic constituents in the wastewater sampled (Muzio *et al.*, 2005).

The results obtained with the *Allium* test were shown in Table 1. This test combines two test targets, toxicity and genotoxicity. Toxicity is easily measured by observation of root growth inhibition and mitotic index, and genotoxicity is detected by frequency of chromosome aberrations. Concentrations of

the San Martín Hospital effluent samples submitted to the *Allium* test were selected considering the growth inhibiting effects of the samples in onion roots growth (data not shown). Growth inhibition was detected when more than 50% v/v of the sample in buffer solution, were submitted to the test. Methyl methanesulfonate (MMS) was used as a positive control. The mitotic index did not shown significant differences between the tested concentrations. These results indicate a low toxicity of the effluent samples and are in accordance with the data obtained with *Pseudomonas fluorescens* (Figure 2). Nevertheless the determinations of chromosome aberrations indicated a clear genotoxic response for the sample corresponding to summer 2003. This effect was not detected in the sample of autumn.

The potential of hospital effluent samples and their XAD concentrates to induce genome rearrangements was investigated by the use of the eukaryotic yeast *S. cerevisiae* D7 strain (Figure 3). The results showed only the induction of gene reversion with summer 2003 wastewater samples. On the other hand the XAD concentrates were toxic in all the samples tested.

The hospital wastewater disposed into the urban sewage system, seems not to pose an obvious toxic pollution hazard. Nevertheless the genotoxicity was detected in samples of summer. The hospital effluent is diluted in the sewage system to a degree that its genotoxic activity probably will be no longer detectable in our battery test, unless the samples were submitted to an XAD concentration. However it does not mean that the genotoxicity is lost. It may still be accumulated in one of the environmental compartments and there create long term ecological effects. Therefore it seems necessary to clarify whether a group of organic compounds contribute to the genotoxic potential of the hospital wastewater. Biodegradability and persistence of the main identified compounds will have to be also analyzed to judge the impact on the environment.

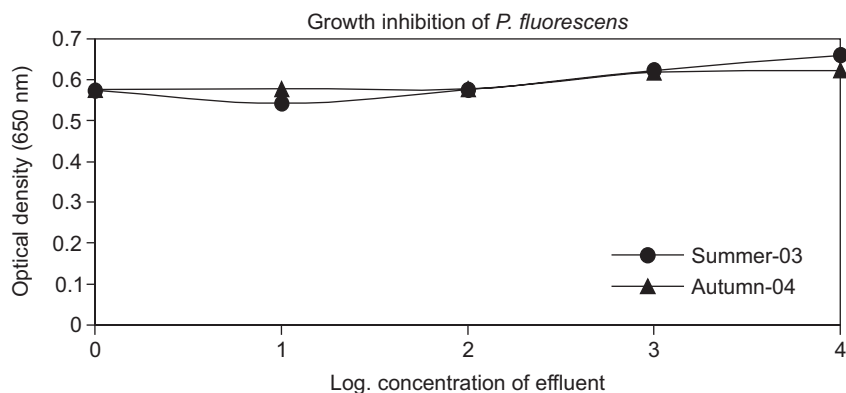


Figure 2 — Results from toxicants assessment of Hospital San Martín waste waters with *P. fluorescens* growth inhibition test. The EC_{50} of the $K_2Cr_2O_7$ was 4.46 ppm.

Table 1 — Results from genotoxicity tests of wastewater samples from San Martín Hospital in the *Allium cepa* chromosome aberration assay.

Effluent %	Mitotic index \pm SD	N. of cells examined	Total aberrations %
Sample 1			
0	80.4 \pm 7.8	409	25.67
10	76.9 \pm 15.0	597	15.08
50	89.6 \pm 9.5	467	31.69*
MMS, 10 mg/L	45.0 \pm 8.3	398	59.05**
Sample 2			
0	74.7 \pm 9.4	501	16.57
50	79.2 \pm 5.0	529	11.91
MMS, 10 mg/L	57.1 \pm 11.6	538	27.51**

*p < 0.05, **p < 0.01 in χ^2 -test. Sample 1: summer 2003; sample 2: autumn 2004. MMS: Methyl Methanesulfonate.

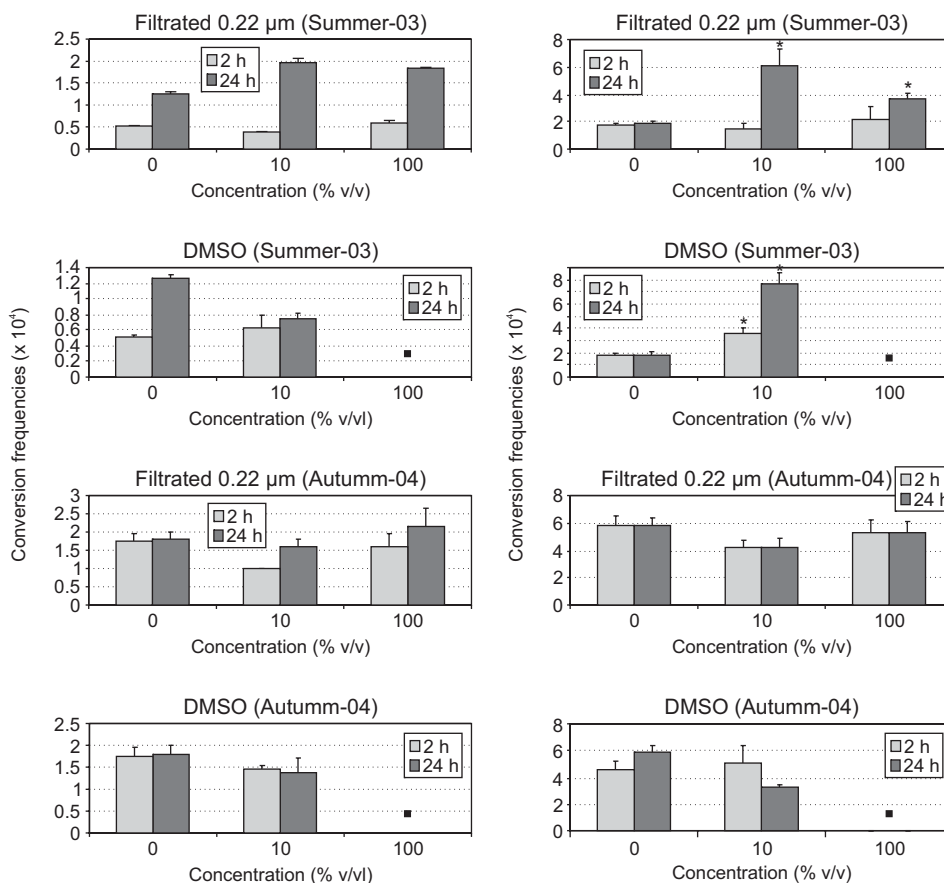


Figure 3 — Conversion and reversion frequencies in *S. cerevisiae* D7. *Significant differences between the samples and control. ■ Toxic effect.

Acknowledgement — This work was partially supported by a grant from the Secretaría de Ciencia y Técnica Universidad de Buenos Aires. We want to thank Ing. Jorge Argento from the Hospital José de San Martín for his collaboration and Bioq. María de Luján Calcagno for her advice in the statistics.

REFERENCES

- BASSI, M. D. & MORETTON, J., 2003, Mutagenicity of antineoplastic drug residues treated in health care waste autoclave. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71: 170-175.
- DELOFFRE-BONNAMOUR, N., 1995, *Les rejets des établissements de santé: Des effluents liquides aux déchets solides*. Mémoire de Maîtrise, Université Claude Bernard-Lyon 1, Institut Universitaire Professionnalisés, Génie de l'Environnement-Ecodéveloppement, Lyon, France, 75p.
- EMMANUEL, E., BLANCHARD, J-M., KECK, G. & PERRODIN, Y., 2001, Caractérisation chimique, biologique et écotoxicologique des effluents hospitaliers. *Déchets Sciences et Techniques, Revue Francophone d'Écologie Industrielle*, 22: 31-33.
- FISKEJÖ, G., 1985, The allium test as a standart environmental monitoring. *Hereditas*, 102: 99-112.
- GADELLE, F., 1995, Le monde manquera-t-il bientôt d'eau? *Sécheresse*, 6: 11-15.
- GARTISER, St., BRINKER, L., ERBE, T., KÜMMERER, K. & WILLMUND, R., 1996, Belastung von Krankenhausabwasser mit gefährlichen stoffen im sinne § 7a WHG. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 24: 2.
- HALLING-SORENSEN, B., 1998, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review. *Chemosphere*, 36: 357-393.
- KÜMMERER, K., 2001, Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources. A review. *Chemosphere*, 45: 957-969.
- KÜMMERER, K., GARTISER, St., ERBE, T. & BRINKER, L., 1998, AOX-emissions from hospital into municipal wastewater. *Chemosphere*, 36: 2437-2445.
- MORENO-ABRIL, O. & CARRILLO GALLEGO, E., 2002, Técnicas de estudio de la mutagenicidad. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 2: 26-32.
- MORETTON, J., BARÓ, P., ZELAZNY, A. & D'AQUINO, M., 1990, Detection of genotoxicants in a polluted watercourse using a yeast system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 45: 25-30
- MORETTON, J., BARÓ, P., ZELAZNY, A. & D'AQUINO, M., 1991, Polluted water concentrates. Induction of genetic alterations in *Saccharomyces cerevisiae* D7 strain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 203-207.
- MUZIO, H. MAGDALENO, A. & MORETTON, J., 2005, Genotoxicity of radiographic photofilm wastewater. Influence of the treatment with a metal exchange unit. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 74: 86-93
- ORTOLAN, M. G. S., 1999, *Avaliação do efluente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: citotoxicidade, genotoxicidade, perfil microbiológico de bactérias mesofílicas e resistência a antibióticos*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 115p.
- PAZ, M., MUZIO, H., GEMINI, V., MAGDALENO, A., ROSSI, S., KOROL, S. & MORETTON, J., 2004, Aguas residuales de un centro hospitalario de Buenos Aires, Argentina: características químicas, biológicas y toxicológicas. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 4: 83-88.
- RICHARDSON, M. L. & BOWRON, J. M., 1985, The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.*, 37: 1-12.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, J., 1994, *Biometry the principles and practice of statistics in biological research*. W. D. Freedman, New York, 880p.
- STUMPF, M., TERNES, T. A., WILKEN, R-D., RODRIGUES, S. V. & BAUMANN, W., 1999, Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment*, 225: 135-141.
- TERNES, T. A., 1998, Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and river. *Wat. Res.*, 32: 3245-3260.
- UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES, 2001, *Anuario Estadístico 2001*. Hospital de Clínicas José de San Martín, Dirección de Estadística y Archivo Médico República Argentina, Buenos Aires, Argentina, 52p.



SETAC - Brazil

Influência do Manganês em Ensaios de Toxicidade com Algas em Amostras Ambientais

A. ARENZON* & M. T. RAYA-RODRIGUEZ

Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, C.P. 15007, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS

RESUMO

Estudos têm sido realizados utilizando ensaios ecotoxicológicos na avaliação da qualidade de águas subterrâneas. Nestes estudos vários autores comentam uma maior sensibilidade nos ensaios com algas para as amostras desses ambientes. Visando a maior conhecimento na utilização de ensaios de toxicidade com algas no monitoramento de águas subterrâneas foi ensaiado um total de 75 amostras distribuídas em 19 poços de monitoramento de uma área industrial da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil. As amostras foram analisadas quanto à toxicidade para *Selenastrum capricornutum* (USEPA, 1994) e quanto aos valores de pH, condutividade elétrica, cloretos, hidrocarbonetos totais, fenóis, nitrogênio amoniacal, sólidos dissolvidos totais e metais (Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Zn, Hg e Ni). As amostras foram coletadas semestralmente, entre janeiro de 2001 e janeiro de 2003. Os dados obtidos demonstraram alta frequência de amostras com efeito inibitório sobre *S. capricornutum* (72%). A análise estatística do conjunto de dados apresentou correlação fraca, porém estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$), entre as concentrações de manganês e a toxicidade observada para *S. capricornutum* ($r = 0,298$). Considerando-se: (1) a baixa disponibilidade do manganês aos organismos em função de sua natural precipitação sob a forma de óxidos de manganês; (2) a eficiência do manganês como captador de metais em ambientes aquáticos através da adsorção, troca iônica e co-precipitação; (3) a ocorrência, para algumas espécies de microalgas, de interações competitivas entre nutrientes e metais inibidores; (4) o fato de o manganês poder tornar indisponíveis metais como Zn, Co, Ni e Cu (utilizados como micronutrientes) através da formação de co-precipitados estáveis de óxidos de manganês; e (5) o constante aporte de oxigênio nas amostras durante a execução dos ensaios com algas devido à agitação orbital dos frascos, conclui-se que não deve ser descartada a possibilidade de interferência desse metal sobre a biodisponibilidade dos micronutrientes acrescentados às amostras para a realização do ensaio de toxicidade com algas.

Palavras-chave: *Selenastrum capricornutum*, biomonitoramento, água subterrânea, manganês.

ABSTRACT

The role of manganese in toxicity assays using algae in environmental samples

Studies using ecotoxicological assays have been employed in the evaluation of the quality of ground water. In these studies, several authors suggested that bioassays using algae are more sensitive for this kind of environment. To have a better knowledge on the applicability of bioassays utilizing algae as test organism in the monitoring of ground water, we analyzed 75 samples from a total of 19 monitoring wells from an industrial area in the Metropolitan region of Porto Alegre, RS, Brazil. The toxicity of these samples was evaluated using *Selenastrum capricornutum* (USEPA, 1994) as test organism. In addition, pH, electrical conductivity, chlorides, total hydrocarbons, phenols, ammoniacal nitrogen, total dissolved solid and metals (Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Zn, Hg and Ni) were also analyzed. Samples were collected twice a year between 2001 and 2003. Results demonstrated a high frequency of samples with inhibitory effect on *S. capricornutum* (72%), and statistical analyses showed a statistically significant correlation ($\alpha = 0.05$) between manganese concentrations and the observed toxicity for *S. capricornutum* ($r = 0.298$). Considering: (1) the low availability of manganese to organisms as a result of its natural precipitation as manganese oxides; (2) the efficiency of manganese in sequestering metals from the aquatic environments by adsorption, ionic exchange, or co-precipitation; (3) the occurrence, for some micro algae species, of competitive interactions between nutrients and inhibitory metals; (4) the fact that manganese could sequester metals like Zn, Co, Ni e Cu

*Corresponding author: Alexandre Arenzon, e-mail: alex@ecologia.ufrgs.br.

(used as micro-nutrients) through the formation of stable co-precipitates of manganese oxides; and (5) the constant input of oxygen in the samples during the running time of the bioassays with algae, due to the orbital agitation of the experimental flasks, it is concluded that the interference of manganese on the bio-availability of the micronutrients added to the samples during the experiment may have occurred.

Key words: *Selenastrum capricornutum*, biomonitoring, ground water, manganese.

INTRODUÇÃO

A utilização de algas na avaliação da toxicidade tem sido importante ferramenta para o monitoramento da qualidade da água superficial e subterrânea (Lukasvsky, 1992). Para a avaliação da água subterrânea este organismo é apontado como mais sensível por diferentes autores (Thomas *et al.*, 1986; Twerdok *et al.*, 1997; Helma *et al.*, 1998; Baun *et al.*, 2000).

A toxicidade é uma resposta de todos os compostos presentes na amostra, inclusive compostos naturais (não introduzidos antropicamente) (Baun *et al.*, 1999; Gustavson *et al.*, 2000). As espécies animais e vegetais podem ser afetadas direta ou indiretamente por poluentes, quando estes induzem mudanças no meio ao qual os organismos são expostos (Mösslacher, 2000). Mudanças nas concentrações-traço e na disponibilidade de nutrientes, por exemplo, podem causar considerável impacto sobre o crescimento vegetal (Saterbak *et al.*, 1999; Franklin *et al.*, 2002). Sunda *et al.* (1976) e Morel *et al.* (1991) enfatizam que, em vez da concentração total, a concentração dissolvida, diretamente disponível dos elementos-traço, é que são responsáveis pelos efeitos sobre o fitoplâncton.

A solubilidade de alguns compostos, principalmente metais, em águas subterrâneas e superficiais é influenciada por interações com outros constituintes da matriz do solo, pela adsorção em minerais de argila, em hidróxidos de ferro e manganês e na matéria orgânica (Freeze & Cherry, 1979). De acordo com Stauber & Florence (1985), o manganês, assim como o ferro, são eficientes captadores de metais em ambientes aquáticos através da adsorção, troca iônica e co-precipitação.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo discutir a possível influência do manganês, naturalmente presente em amostras ambientais na forma de óxido de manganês, sobre os efeitos tóxicos observados em ensaios de toxicidade com a alga *Selenastrum capricornutum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 75 amostras de água subterrânea foram coletadas em 19 poços de monitoramento distribuídos em uma área potencialmente impactada da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. Os poços amostrados apresentavam captação em profundidades que variam de 2,3 metros a 20 metros

e forneceram informações referentes a dois diferentes aquíferos presentes na área de estudo: um aquífero livre e um aquífero semiconfinado.

As amostras foram coletadas semestralmente, sendo que o aquífero livre foi amostrado de janeiro de 2001 a janeiro de 2003 e o aquífero semiconfinado, de fevereiro de 2002 a janeiro de 2003. Para a realização da amostragem foi utilizada a metodologia proposta no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Águas da CETESB (CETESB, 1987).

O esgotamento dos poços de monitoramento foi realizado para a remoção da água estagnada no poço e no pré-filtro, de forma que esta fosse substituída pela água da formação. Para a realização desta tarefa, no aquífero livre foi utilizada uma motobomba com vazão de 6.000 litros/hora, pelo período de tempo necessário para a remoção de três vezes o volume do poço ou até o esgotamento do mesmo. Para o aquífero semiconfinado foi utilizada bomba elétrica submersa de três polegadas, com vazão de 1.500 litros/hora, durante um período mínimo de 45 min, garantindo a extração de, no mínimo, seis vezes o volume do poço.

As amostras foram obtidas com coletadores descartáveis de polietileno, do tipo *Bailer*, com volume útil de um litro.

As amostras foram analisadas quanto aos valores de pH, condutividade, cloretos, hidrocarbonetos totais, fenóis, nitrogênio amoniacal, sólidos dissolvidos totais e metais (Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Zn, Hg e Ni).

Os ensaios de toxicidade foram realizados com a alga *Selenastrum capricornutum* (também conhecida como *Raphidocelis subcapitata* ou *Pseudokirchneriella subcapitata*), conforme USEPA (1994). Em todos os ensaios as soluções-teste foram compostas de 97,7% de água subterrânea, acrescentada de 1,3% de solução nutritiva e 1,0% de suspensão algácea.

Para os ensaios de inibição do crescimento com a alga *S. capricornutum* as soluções-teste foram inoculadas com uma suspensão algácea capaz de conferir concentração de 10^4 cel.ml⁻¹ em um volume final de 100 ml por réplica. Foram utilizadas 4 réplicas para cada amostra, mantidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em uma intensidade luminosa de 3.500 lux por 96 horas em constante agitação. Após o período de exposição, a densidade algácea foi medida através da leitura da absorbância no comprimento de onda de 684 nm (Rodrigues, 2002) e o resultado comparado ao grupo-controle.

Após a execução dos ensaios de toxicidade, o caráter de tóxico ou não-tóxico foi conferido às amostras com auxílio do programa computacional "TOXSTAT 3.3 Computer Program" (Gulley *et al.*, 1988), determinando estatisticamente as amostras que apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos-controle.

O grau de relacionamento entre os níveis de concentração dos parâmetros químicos avaliados e os resultados dos ensaios de toxicidade foram medidos através do coeficiente de correlação de Spearman ($\alpha = 0,05$). Como medida da toxicidade foram utilizadas as diferenças percentuais entre os grupos-controle e os grupos expostos a cada uma das amostras avaliadas.

Todas as análises estatísticas envolvendo os parâmetros químicos avaliados foram não-paramétricas em função da grande variabilidade dentro de cada parâmetro, do pequeno número de repetições em cada ambiente e da grande quantidade de valores não detectados encontrados nas análises químicas realizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o total de amostras analisadas, os dados obtidos demonstraram alta frequência de amostras com efeito inibitório sobre *S. capricornutum* (72%). Para as amostras do aquífero livre, quimicamente mais impactado, foram observados efeitos de toxicidade estatisticamente significativos para *S. capricornutum* em 84% das amostras. Já para o aquífero semiconfinado foram observados efeitos de toxicidade estatisticamente significativos em 60% das amostras (Tabela 1). Os percentuais de amostras com efeitos inibitórios para *S. capricornutum* foram consideravelmente superiores aos reportados por Arenzon (2004) para as mesmas amostras. Segundo esse autor foram observados percentuais de 26% de amostras com efeitos tóxicos para o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e 24% para o peixe *Pimephales promelas*.

Considerando-se o percentual de toxicidade apresentado por amostra (diferença do percentual de efeito causado por

amostra em relação ao percentual observado no respectivo grupo-controle) e sua correlação com os resultados das análises químicas realizadas nos dois ambientes avaliados, foi possível verificar alguns valores estatisticamente significativos que permitiram identificar parâmetros que poderiam estar influenciando a toxicidade observada. Uma fraca correlação positiva ($r = 0,298$), porém estatisticamente significativa ($p < 0,05$), foi observada entre a toxicidade para *S. capricornutum* e a concentração de manganês nas amostras do aquífero livre (Tabela 2).

Dos metais avaliados, o manganês total foi o único detectado na maioria dos poços de monitoramento em todas as amostragens realizadas, ocorrendo em 87% das amostras do aquífero livre e em 100% para o aquífero semiconfinado. Quando detectado, o manganês foi observado em concentrações entre 0,024 mg.L⁻¹ e 2,25 mg.L⁻¹. Dados disponíveis sobre as águas subterrâneas da área estudada (FAURGS, 2003) mencionam as concentrações observadas de manganês como decorrentes da composição natural do solo do local.

São encontrados na literatura dados referentes à toxicidade do manganês para algas. Concentrações de manganês entre 3 e 50 mg.L⁻¹ são causadoras de inibição da divisão celular, da fotossíntese e da captura de carbono em *Chlorella*, conforme reportado por Christensen & Scherfig (1979). Esses mesmos autores reportam ainda que a concentração de 3,1 mg.L⁻¹ de manganês é suficiente para causar redução de 50% no crescimento celular de *S. capricornutum*. Hue *et al.* (1998) apresentam concentrações entre 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹ de manganês como sendo o limite para a observação de efeitos danosos desse elemento sobre plantas cultivadas. Entretanto, segundo Foster & Gomes (1989) e FAURGS (2003), a tendência à precipitação sob a forma de óxidos do manganês em águas subterrâneas reduz consideravelmente sua disponibilidade aos organismos aquáticos e, conseqüentemente, sua probabilidade de causar efeitos tóxicos diretos. Segundo Franklin *et al.* (2002), interações competitivas entre nutrientes e metais inibidores têm sido identificadas para algumas espécies de microalgas.

Tabela 1 — Percentual de amostras de águas subterrâneas que apresentaram toxicidade para *S. capricornutum* nas amostras do aquífero livre (A) e para o aquífero semiconfinado (B) da área de estudo, em cada uma das campanhas amostrais.

A			B		
Campanha amostral	Nº amostras	Toxicidade para <i>S. capricornutum</i>	Campanha amostral	Nº amostras	Toxicidade para <i>S. capricornutum</i>
Jan-2001	9	100%	Fev-2002	10	40%
Ago-2001	9	89%	Ago-2002	10	80%
Jan-2002	9	78%	Jan-2003	10	60%
Ago-2002	9	78%	—	—	—
Jan-2003	9	78%	—	—	—
Média	9	84%	Média	10	60%

Tabela 2 — Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros químicos analisados e o grau de toxicidade definido pelas diferenças percentuais obtidas entre os grupos-controle e os grupos expostos a cada uma das amostras avaliadas nos poços de monitoramento do aquífero livre da área de estudo.

Parâmetros analisados	Coeficiente de correlação de Spearman
Nitrogênio amoniacal	-0,076
Cloretos	-0,211
Condutividade	0,219
Fenóis	-0,172
Fósforo	-0,268
Hidrocarbonetos totais	0,119
pH	0,127
Sólidos dissolvidos totais	-0,093
Cd	0,012
Mn	0,298*
Ni	-0,155
Pb	-0,130
Zn	0,005

* Correlação significativa $p < 0,05$.

De acordo com esses autores, o manganês pode indisponibilizar metais como o cádmio, zinco e cobre. Stuetz *et al.* (1996) concluíram que íons de cobre, zinco, cobalto e níquel podem ser indisponibilizados pela formação de co-precipitados estáveis de óxidos de manganês, através da oxidação desse metal por algas e bactérias. De acordo com Stauber & Florence (1985), em ensaios de toxicidade com cobre e manganês utilizando algas como organismo-teste, uma concentração de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de manganês foi suficiente para reduzir a toxicidade do cobre. O manganês adere-se à membrana celular das algas e adsorve metais como o cobre, impedindo sua absorção pela célula.

Assim, os metais contidos na solução-teste dos ensaios de toxicidade poderiam ter suas disponibilidades afetadas por um constituinte natural da área de estudo, influenciando os resultados obtidos, podendo causar falsos resultados de toxicidade.

CONCLUSÃO

Considerando-se: (1) a baixa disponibilidade natural do manganês aos organismos em função de sua natural precipitação sob a forma de óxidos de manganês; (2) a eficiência do manganês como captador de metais em ambientes aquáticos através da adsorção, troca iônica e co-precipitação; (3) a ocorrência, para algumas espécies de microalgas, de interações competitivas entre nutrientes e metais inibidores; (4) o fato de o manganês poder tornar indisponíveis metais como Zn, Co, Ni e Cu (utilizados como micronutrientes para o crescimento

de algas) através da formação de co-precipitados estáveis de óxidos de manganês; e (5) o constante aporte de oxigênio nas amostras durante a execução dos ensaios com algas devido à agitação orbital dos frascos, conclui-se que não deve ser descartada a possibilidade de interferência desse metal, naturalmente presente na grande maioria das amostras ambientais, sobre a biodisponibilidade dos micronutrientes acrescentados às amostras para a realização do ensaio de toxicidade com algas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENZON, A., 2004, *Ensaio ecotoxicológico no monitoramento da qualidade de águas subterrâneas potencialmente impactadas*. Tese de Doutorado em Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, 94p.
- BAUN, A., JENSEN, S. D., BJERG, P. L., CHRISTENSEN, T. H. & NYHOLM, N., 2000, Toxicity of organic chemical pollution in groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Toxicol. Chem.*, 34(9): 1647-1652.
- BAUN, A., KLOEFT, L., BJERG, P. L. & NYHOLM, N., 1999, Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with landfill leachate. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(9): 2046-2053.
- CETESB, 1987, *Guia de coleta e preservação de amostras de água*. Coord. Edmundo Garcia Agudo. São Paulo, 150p.
- CHRISTENSEN, E. R. & SCHERFIG, J., 1979, Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella atigmatophora*. *Water Res.*, 13(1): 79-92.
- FAURGS, 2003, *Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e metais pesados no solo e água subterrânea e instalações de poços de monitoramento na Refinaria Alberto Pasqualini/REFAP S.A., Canoas, RS*. Relatório Técnico, Etapa II, 172.

- FOSTER, S. & GOMES, D. C., 1989, *Monitoreo de la calidad de las aguas subterráneas: una evaluación de métodos e costos*. Lima, Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Medio Ambiente – CEPIS. Disponível em: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/repind46/monito/monito.html>.
- FRANKLIN, N. M., STAUBER, J. L., LIM, R. P. & PETOCZ, P., 2002, Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(11): 2412-2422.
- FREEZE, R. A. & CHERRY, J. A., 1979, *Groundwater*. Englewood Cliffs, NJ, Prentice-Hall, 604p.
- GULLEY, D. D., BOELTER, A. M. & BERGMAN, H. L., 1988, *Toxstat version 2.1*. Fish Physiology and Toxicology Laboratory, Laramie, WY, Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming.
- GUSTAVSON, K. E., SONSTHAGEN, S. A., CRUNKILTON, R. A. & HARKIN, J. M., 2000, Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analyses. *Environ. Toxicol.*, 15(5): 421-430.
- HELMA, C., ECKL, P., GOTTMANN, E., KASSIE, F., RODINGER, W., STEINKELLNER, H., WINDPASSINGER, C., SCHULTE-HERMANN, R. & KNASMULLER, S., 1998, Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters. *Environmental Science & Technology*, 32(12): 1799-1805.
- HUE, N. J., SILVA, J. A. & ARIFIN, R., 1988, Sewage sludge-soil interactions as measured by plant and soil chemical composition. *J. Environ. Qual.*, 17: 384-390.
- LUKAVSKY, J. S., 1992, The evaluation of algal growth-potential (AGP) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Water Res.*, 26(10): 1409-1413.
- MOREL, F. M. M., HUDSON, R. J. M. & PRICE, N. M., 1991, Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol Oceanogr.* 36: 1742-1755.
- MÖSSLACHER, F., 2000, Sensitivity of groundwater and surface water crustaceans to chemical pollutants and hypoxia: implication for pollution management. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 149(1): 51-66.
- RODRIGUES, L. H., 2002, *Avaliação da sensibilidade de Raphidocelis subcapitata (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrofotometria*. Dissertação de Mestrado em Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, 84p.
- SATERBAK, A., 1999, Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 1591-1607.
- STAUBER, J. L. & FLORENCE, T. M., 1985, Interactions of copper and manganese: a mechanism by which manganese alleviates copper toxicity to the marine diatom, *Nitzschia closterium* (Ehrenberg). *Aquatic Toxicol.*, 7: 241-254.
- STUETZ, R. M., GREENE, A. C. & MADGWICK, J. C., 1996, The potential use of manganese oxidation in treating metal effluents. *Minerals Engineering*, 9(12): 1253-1261.
- SUNDA, W. G. & GUILLARD, R. R. L., 1976, The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.*, 34: 511-529.
- THOMAS, J. M., SKALSKI, J. R., CLINE, J. F., MCSHANE, M. C. & SIMPSON, J. C., 1986, Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 487-501.
- TWERDOK, L. E., BURTON, D. T., GARDNER, H. S., SHEDD, T. R. & WOLFE, M. J., 1997, The use of nontraditional assays in an integrated environmental assessment of contaminated ground water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(9): 1816-1820.
- USEPA, 1994, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. 3 ed. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268. EPA/600/4-91/002.



Comportamento de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) em Solo com Glifosato: Testes de Fuga em Laboratório

J. C. NIEMEYER,^{1*} V. C. DOS SANTOS,¹ J. M. L. RODRIGUES² & E. M. DA-SILVA¹

¹Universidade Federal da Bahia, Rua Barão do Geremoabo, s/n, Campus Ondina, Salvador, Bahia

²Universidade do Aveiro, Portugal

RESUMO

Testes agudos e testes de fuga foram realizados com populações laboratoriais do isópodo *Cubaris murina* para avaliar sua sensibilidade ao glifosato. As soluções contaminantes foram preparadas a partir do herbicida Roundup®. Nos testes agudos, dez filhotes foram confinados e expostos em cada tratamento: solo com três concentrações diferentes de glifosato e solo controle (sem contaminante). A mortalidade foi observada após 7 dias. Utilizou-se o teste de Spearman-Kärber para calcular a LC₅₀. Nos testes de fuga, dez juvenis foram soltos no centro de cada recipiente-teste, com quatro porções de solo: três porções com diferentes concentrações de glifosato e um controle. A preferência dos isópodos foi registrada após 1,5, 2, 3, 4 e 24 horas. Utilizou-se ANOVA para verificar se houve diferenças significativas entre o número médio de isópodos em cada tratamento e o controle. A 7-d-LC₅₀ foi de 35,5 mg gli/g solo. Nos testes de fuga, diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle, indicando a fuga, ocorreram em todos os tratamentos, inclusive em 5,12 mg gli/g solo, já após 1,5 hora. O comportamento de fuga foi um alvo fisiológico muito sensível, avaliável em experimentos de baixo custo, apresentando uma resposta rápida e de grande relevância ecológica.

Palavras-chave: ecotoxicologia, isopoda, glifosato, mortalidade, testes de fuga.

ABSTRACT

Behavior of *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) in soil contaminated with glyphosate: avoidance tests in laboratory

Acute tests and avoidance tests were carried out using laboratory populations of *Cubaris murina*, to assess their sensitivity to glyphosate. The contaminant solutions were prepared by herbicide Roundup®. In the acute tests, ten offspring were confined and exposed to each treatment: soil with different concentrations of glyphosate and soil without contaminant (control). Mortality was observed after 7 days. The Spearman-Kärber test was used to calculate the LC₅₀. In the avoidance tests, ten juveniles were put on the center of each recipient-test, with four portions of soil: three portions with different concentrations of glyphosate and one control. The preference of the isopods was registered after 1.5, 2, 3, 4 and 24 hours. ANOVA was used to verify whether there were significant differences among the mean number of isopods in each treatment and the control. The 7-d-LC₅₀ was 35.5 mg gli/g soil. In the avoidance tests, significant differences ($p < 0.05$) in relation to the control, which indicated avoidance, occurred in all treatments, including 5.12 mg gli/g soil, already at 1.5 hour. The avoidance behavior was a very sensitive endpoint, assessed in low cost experiments, showing a rapid response and having an important ecological role.

Key words: ecotoxicology, isopoda, glyphosate, mortality, avoidance tests.

INTRODUÇÃO

Atualmente, testes de toxicidade baseados em *alvos fisiológicos* que avaliam alterações bioquímicas, comportamentais ou histológicas têm sido desenvolvidos em lugar das

tradicionais respostas na sobrevivência, crescimento e reprodução (Drobne, 1997). Porém, os alvos fisiológicos mais comumente usados nos estudos com isópodos ainda são mortalidade, crescimento e reprodução. Ainda segundo Drobne (1997), a desvantagem de usar a mortalidade é que se trata

*Corresponding author: Júlia Carina Niemeyer, e-mail: juliacarina@yahoo.com.br.

de um alvo de baixa sensibilidade; já crescimento e reprodução podem requerer experimentos de longa duração, além da alta variabilidade individual das respostas.

Testes de comportamento de fuga podem ser indicadores muito sensíveis de contaminação química. Dados sobre preferências e fuga são relativamente simples de ser coletados e ecologicamente relevantes, além do baixo custo e da resposta rápida (Yearley *et al.*, 1996).

Mudanças comportamentais induzidas por xenobióticos podem alterar o regime de exposição de um organismo ao tóxico e podem ser importantes para a avaliação do risco ambiental, desde que o risco seja em função da probabilidade de exposição e suscetibilidade ao tóxico (Yearley *et al.*, 1996).

Testes de fuga vêm sendo realizados com organismos aquáticos, como peixes (Svecevicus, 2001), cladóceros (Lopes *et al.*, 2004) e anfípodos (Kravitz *et al.*, 1999), e principalmente com organismos terrestres, como minhocas (Yearley *et al.*, 1996) e isópodos (Loureiro *et al.*, 2002; Odendaal & Reinecke, 1999).

Em muitos estudos, o comportamento de fuga tem sido muito mais sensível do que a letalidade (Yearley *et al.*, 1996). Alguns exemplos são os trabalhos de: Kravitz *et al.* (1999), sobre a resposta de anfípodos a sedimentos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos; Svecevicus (2001), sobre a resposta de trutas a misturas de metais pesados; e Lopes *et al.* (2004), sobre a evitação da contaminação com chumbo por *Daphnia longispina*.

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivos determinar a LC_{50} (concentração letal para 50% dos organismos) do glifosato para a espécie *Cubaris murina* Brandt (1833) e verificar se há nesse isópodo a capacidade de evitar ou não o solo contaminado com glifosato em concentrações menores que a LC_{50} .

MATERIAIS E MÉTODOS

Os isópodos utilizados nos testes foram oriundos de uma fazenda em Simões Filho, Bahia, sendo mantidos por várias gerações em laboratório há cerca de dois anos. O solo utilizado foi o mesmo dos cultivos dos isópodos no laboratório, oriundo do Centro de Mandioca e Fruticultura – EMBRAPA (Cruz das Almas). O solo foi peneirado antes do uso.

Testes agudos foram realizados para encontrar a 7-d- LC_{50} (concentração letal para 50% dos organismos em 7 dias) do glifosato para *Cubaris murina*. Optou-se pelos ensaios com duração de 7 dias devido à resistência dessa espécie ao glifosato em ensaios com duração de 48 horas, já verificada anteriormente (Niemeyer, 2004). Para a montagem dos testes agudos, porções de 75 g de solo foram pesadas e contaminadas com soluções preparadas a partir do herbicida Roundup® e água destilada. Posteriormente, o solo foi homogeneizado e distribuído entre as réplicas da mesma concentração, em recipientes de

vidro com 7 cm de diâmetro e 4 cm de altura. No controle, utilizaram-se apenas solo e água destilada. As concentrações utilizadas foram: controle, C1 (12 mg gli/g solo), C2 (24 mg gli/g solo) e C3 (48 mg gli/g solo).

Os filhotes utilizados, com quatro a sete dias de vida, foram distribuídos aleatoriamente entre as réplicas, perfazendo um total de dez indivíduos por réplica, com os testes sendo realizados em triplicata. Utilizaram-se filhotes por se acreditar que nessa fase os indivíduos são mais sensíveis do que na fase adulta. Durante o experimento, nenhum alimento foi adicionado. O número de sobreviventes em cada tratamento após o período determinado foi registrado. Os dados foram lançados no programa TSK, Teste de Spearman-Kärber, para calcular a LC_{50} .

Para os testes de fuga, foram utilizadas 6 bandejas plásticas de 34 cm de diâmetro e 11 cm de altura, seguindo a distribuição das concentrações em cada réplica (Figura 1).

Para testar a hipótese de que os isópodos distribuem-se aleatoriamente entre os quadrantes dos recipientes-teste, um experimento inicial foi realizado sem contaminante algum, apenas com solo e água destilada em todos os quadrantes. As leituras e a análise dos dados foram realizadas da mesma forma que no teste com contaminante.

Em cada réplica havia quatro quadrantes: um controle (Co) e três concentrações crescentes de glifosato (C1, C2 e C3). Cada quadrante dentro das réplicas continha 75 g de solo, com aproximadamente 1,5 cm de altura, contaminado com a respectiva solução contaminante ou contendo apenas água destilada (controle). As soluções contaminantes foram preparadas a partir do herbicida Roundup® e água destilada, em balões volumétricos. As concentrações nominais iniciais de glifosato usadas foram 5,12 mg gli/g solo (C1), 10,24 mg gli/g solo (C2) e 20,48 mg gli/g solo (C3).

No centro de cada réplica, dez indivíduos de *C. murina* da população mantida em laboratório foram soltos. Utilizaram-se organismos juvenis, de ambos os sexos, que não continham acúmulos de cálcio (que antecedem a ecdise). Os organismos foram distribuídos aleatoriamente entre as réplicas. Borrifadas de água destilada foram adicionadas às paredes internas das bandejas-teste, e as mesmas permaneceram parcialmente cobertas com uma tampa escura, evitando a excessiva evaporação da água e reduzindo a incidência de luz.

Os isópodos puderam andar livremente entre os quadrantes. As leituras foram realizadas após 1,5, 2, 3, 4 e 24 horas, observando-se quantos isópodos estavam presentes em cada quadrante. Os isópodos que se encontravam nos espaços entre os quadrantes não foram considerados na análise.

Para a análise dos dados do teste de fuga, utilizou-se análise de variância (ANOVA), de entrada única, para verificar se as médias obtidas no controle apresentavam diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparadas às médias das demais concentrações, para cada leitura realizada (Zar, 1996).

Para verificar se as concentrações diferiam entre si quanto ao número de isópodos, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Com o teste de Bartlett, verificou-se a homogeneidade das amostras; em alguns casos, o mesmo recomendou o uso de ANOVA não-paramétrica. Nesses casos, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No resultado do teste agudo, o isópodo *Cubaris murina* apresentou-se pouco sensível ao glifosato, sendo a 7-d-LC₅₀ do glifosato para essa espécie igual a 35,55 mg gli/g solo (31,89-

39,62). Os resultados evidenciam a necessidade de estudar outros *alvos fisiológicos* mais sensíveis do que mortalidade para essa espécie, em relação ao glifosato.

Quanto aos testes de fuga, no experimento inicial sem contaminantes, os isópodos distribuíram-se aleatoriamente, não havendo diferenças estatísticas entre os quadrantes (Figura 2). Sendo assim, realizou-se o experimento com solo contaminado.

No experimento onde se utilizou solo contaminado com glifosato, pôde-se notar imediata evitação aos quadrantes contaminados, que apresentaram diferenças significativas em relação ao controle já 1,5 hora após o início do experimento (Figura 3).

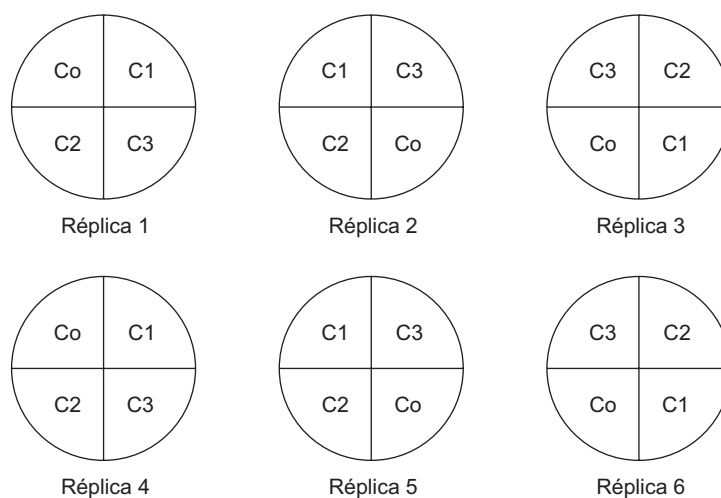


Figura 1 — Diagrama esquemático da distribuição das concentrações nas seis réplicas do teste de fuga.

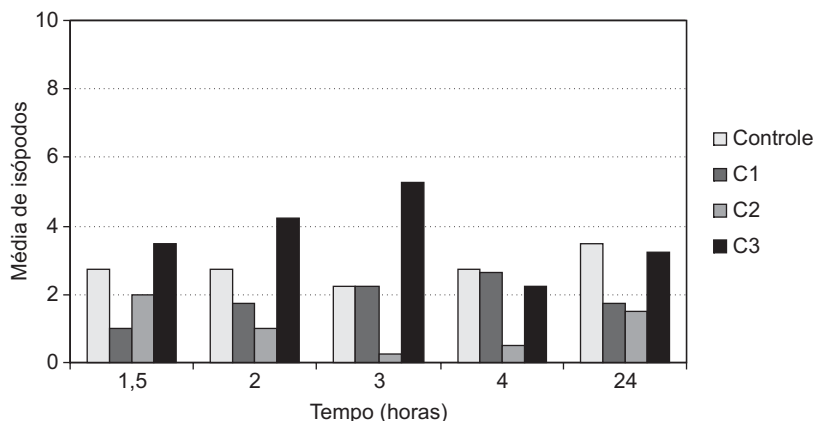


Figura 2 — Número médio de isópodos em cada quadrante nos diferentes horários de leitura após o início do experimento. Experimento inicial, utilizando apenas solo e água destilada em todos os quadrantes, demonstrando a distribuição aleatória dos isópodos.

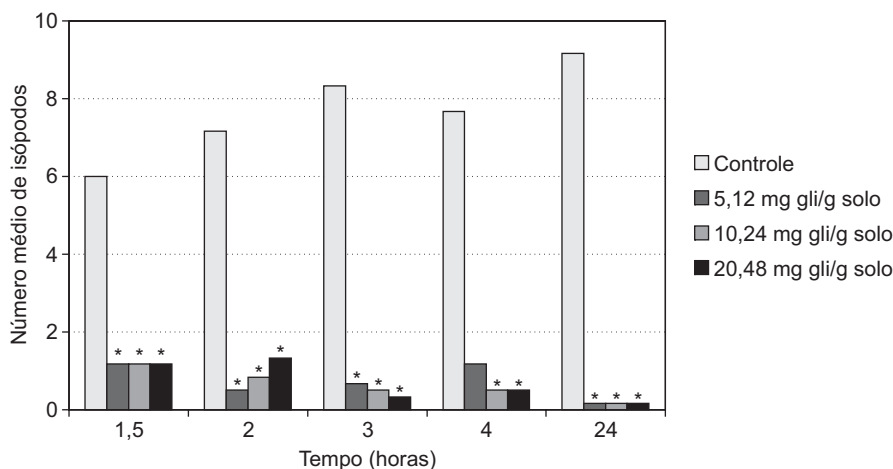


Figura 3 — Número médio de isópodos em cada tratamento nos diferentes horários de leitura após o início do experimento. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Já entre os quadrantes contaminados, estes nunca foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$) quanto ao número médio de isópodos.

Van Straalen & Van Rijn (1998) afirmam que “reprodução e crescimento são alvos fisiológicos mais relevantes do que mortalidade, porque os efeitos nestes parâmetros aparecem a menores níveis de exposição”.

Sendo assim, no presente trabalho, o comportamento de fuga foi um *alvo fisiológico* mais relevante do que a mortalidade, devido à sua sensibilidade em detectar o glifosato. Enquanto a 7-d-LC₅₀ do glifosato para essa espécie foi 35,5 mg gli/g solo, o comportamento de fuga ocorreu até mesmo para a concentração de 5,12 mg gli/g solo, já após 1,5 hora do início do experimento. Além de ser muito sensível e de apresentar resposta rápida, o comportamento de fuga pôde ser observado através de experimentos de baixo custo.

Segundo Lopes *et al.* (2004), se as populações naturais têm a habilidade de fugir do ambiente contaminado antes que efeitos letais ou subletais ocorram, então o desaparecimento desses animais é equivalente à erradicação da população inteira. Isso demonstra a relevância ecológica de estudos sobre o comportamento de fuga dos organismos, pois testes onde os mesmos ficam confinados tornam os resultados distantes da realidade, nos casos em que a fuga seja provável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DROBNE, D., 1997, Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(6): 1159-1164.

KRAVITZ, M. J., LAMBERSON, J. O., FERRARO, S. P., SWARTZ, R. C., BOESE, B. L. & SPECHT, D., 1999, Avoidance response of the estuarine amphipod *Eohaustorius estuarius* to polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated, field-collected sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(6): 1232-1235.

LOPES, I., BAIRD, D. J. & RIBEIRO, R., 2004, Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1702-1708.

LOUREIRO, S., ROMBKE, J. & SOARES, A. M. V. M., 2002, Testes de resposta de evitamento: a capacidade de escolha de um solo com melhor qualidade. In: A. Duarte, T. R. Santos, A. Panteleitchouk & R. Prego (eds.), *Ecotoxicologia e remoção de poluentes: estudos na Península Ibérica*. Instituto Piaget, Lisboa, pp. 47-53.

NIEMEYER, J. C., 2004, *Aspectos biológicos de Cubaris murina Brandt (Crustacea: Isopoda) em laboratório e seu uso em Ecotoxicologia: estudo da sensibilidade ao Glifosato*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento.

ODENDAAL, J. P. & REINECKE, A. J., 1999, The toxicity of sublethal lead concentrations for the woodlouse, *Porcellio laevis* (Crustacea, Isopoda). *Biol. Fertil Soils*, 29: 146-151.

SVECEVICIUS, G., 2001, Avoidance response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to heavy metal model mixtures: a comparison with acute toxicity tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67: 680-687.

VAN STRAALLEN, N. M. & VAN RIJN, J. P., 1998, Ecotoxicological risk assessment of soil fauna recovery from pesticide application. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 154: 83-141.

YEARLEY, R. B., LAZORCHAK, J. M. & GAST, L. C., 1996, The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1532-1537.

ZAR, J. H., 1996, *Biostatistical analysis*. 3. ed. Prentice-Hall, Londres.



Efeitos na Biomassa de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) Expostos ao Solo com Glifosato em Laboratório

J. C. NIEMEYER,^{1*} D. VILAÇA² & E. M. DA-SILVA¹

¹Universidade Federal da Bahia, Rua Barão do Geremoabo, s/n, Campus Ondina, Salvador, Bahia

²Universidade Católica de Salvador

RESUMO

Os isópodos terrestres desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes, contribuindo para os primeiros processos de decomposição do folhicho. Neste trabalho, foram utilizados indivíduos oriundos de cultivo laboratorial do isópodo terrestre *Cubaris murina* em ensaios ecotoxicológicos, buscando-se avaliar sua sensibilidade ao glifosato através de efeitos na biomassa. As soluções contaminantes foram preparadas a partir do herbicida Roundup®. As concentrações nominais iniciais usadas foram 4,8; 9,6; 14,4; e 19,2 mg glifosato/g solo. Dez filhotes com 2 a 4 dias de vida foram expostos em cada tratamento e em um controle. Os tratamentos, em quadruplicata, receberam borrifadas de água destilada regularmente. Ao final de cinco semanas, os isópodos foram pesados, e o peso médio dos indivíduos de cada tratamento foi comparado com o controle, utilizando-se ANOVA. Diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,001$) foram encontradas nos tratamentos com 14,4 e 19,2 mg glifosato/g solo nas duas vezes em que o experimento foi realizado. Efeitos na biomassa mostraram-se mais sensíveis do que a 7-d-LC₅₀ do glifosato para *C. murina* (35,5 mg gli/g solo).

Palavras-chave: ecotoxicologia, isopoda, glifosato, biomassa.

ABSTRACT

Effects on biomass of *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) exposed to soil contaminated with glyphosate in laboratory studies

Terrestrial isopods play an important role in the cycling of nutrients, contributing to the first processes of litter decomposition. In this work, organisms of *Cubaris murina* from laboratory cultures were used in ecotoxicity tests, to assess their sensibility to glyphosate how it affects their biomass. The contaminant solutions were prepared by herbicide Roundup®. The initial nominal concentrations were 4.8, 9.6, 14.4 and 19.2 mg glyphosate/g soil. Ten offspring of 2 to 4 days old were exposed in each treatment and in one control. All the treatments, in quadruplicate, received regularly sprays of distilled water. After five weeks, the isopods were weighed, and the mean weight of the isopods of each treatment was compared to the control, using ANOVA. Significant differences in relation to control ($p < 0.001$) were encountered on 14.4 and 19.2 mg gli/g soil in two repetitions of the experiment. Effects on biomass showed more sensibility than 7-d-LC₅₀ of glyphosate to *C. murina* (35.5 mg gli/g soil).

Key words: ecotoxicology, isopoda, glyphosate, biomass.

INTRODUÇÃO

Alvos fisiológicos ou *endpoints* como sobrevivência, crescimento e reprodução são respostas mensuráveis a poluentes (Drobne, 1997). A mudança na massa do corpo é geralmente reconhecida como um sensível *alvo fisiológico* em estudos

de toxicidade com invertebrados (Odendaal & Reinecke, 1999), devido à relevância ecológica deste parâmetro.

Vários trabalhos vêm sendo realizados com isópodos terrestres, utilizando a biomassa ou reservas de energia dos organismos como resposta a substrato ou dieta contaminada. Khalil *et al.* (1995) constataram que o crescimento de *Porcellio*

*Corresponding author: Júlia Carina Niemeyer, e-mail: juliacarina@yahoo.com.br.

scaber foi seriamente afetado pela exposição ao cádmio, através do alimento contaminado, por seis semanas.

Ainda sobre metais pesados, Odendaal & Reinecke (1999) estudaram os efeitos subletais do chumbo para o isópodo *Porcellio laevis* em experimentos que duraram oito semanas, tendo os resultados indicado que o chumbo afetou negativamente o peso dos isópodos.

Vink et al. (1995) demonstraram que a rota de exposição é de grande importância para a determinação de efeitos letais e subletais de pesticidas em isópodos. Usando três pesticidas (benomyl, carbofuran e diazinon), testando separadamente as vias de exposição *substrato* e *alimento* para o isópodo *Porcellionides pruinosus*, concluíram que foi mais crítica para o isópodo a exposição através do substrato do que através do alimento. Os valores para LC_{50} (concentração letal para 50% dos organismos) de benomyl e diazinon para o isópodo chegou a ser 25 vezes menor quando a via de exposição foi o substrato. Os autores explicam que o substrato pode ser uma rota de exposição mais crítica devido ao fato de ele geralmente conter menos matéria orgânica do que os itens alimentares. Sabe-se que substâncias tóxicas como pesticidas são menos disponíveis e menos tóxicas aos organismos onde há grande quantidade de matéria orgânica, devido à adsorção do pesticida a ela.

Estudando os efeitos subletais do organofosforado dimetoato para o isópodo terrestre *Porcellio scaber*, Fischer et al. (1997) observaram redução no crescimento e na taxa reprodutiva quando o produto foi misturado ao solo. Os isópodos ficaram expostos ao pesticida durante quatro semanas. O valor de EC_{50} (concentração de efeito para 50% dos organismos) do dimetoato para a taxa de crescimento foi em torno da metade da LC_{50} . O dimetoato foi mais tóxico a *P. scaber* quando misturado ao solo do que quando misturado à dieta. Como a cutícula de *Porcellio* sp. é constituída por 53-54% de água, embora traços de lipídios estejam presentes, a cutícula não forma efetiva barreira ao fluxo de água (Warburg, 1993), o que pode ser uma provável explicação para o fato de a exposição pelo solo contaminado (via absorção) ser mais crítica do que o alimento contaminado.

Estudos sobre a toxicidade de herbicidas já vêm sendo realizados com isópodos terrestres. Eijssackers (1991) concluiu que o isópodo *Philoscia muscorum* foi afetado por contato direto, ingestão de herbicida acumulado no folhíço e reduzida taxa de consumo devido aos herbicidas 2,4,5-T, amitrole e glifosato. Dependendo da combinação específica do folhíço e herbicida, isto pode afetar a fragmentação do folhíço, primeiro passo para a ciclagem da matéria orgânica na natureza.

Mohamed et al. (1992) constataram que a sobrevivência e o peso do isópodo *Hemilepistus reaumuri* foram adversamente afetados pelo glifosato em experimentos que duraram sete dias e cuja via de exposição foi o substrato.

Em ensaios ecotoxicológicos agudos, com duração de sete dias, o isópodo *Cubaris murina* apresentou grande resistência ao glifosato, cuja 7-d- LC_{50} foi de 35,5 mg glifosato/g solo (Niemeyer, 2004). Devido à ausência de estudos sobre efeitos subletais em *Cubaris murina*, e pelo fato de os isópodos serem usados como representantes da fauna macrodecompositora do solo nos estudos sobre os efeitos de pesticidas em espécies não-alvo, buscou-se neste trabalho pesquisar os efeitos do glifosato, herbicida amplamente utilizado, sobre essa espécie de isópodos. Os alvos fisiológicos escolhidos foram biomassa (peso médio dos indivíduos em cada tratamento) e sobrevivência, após cinco semanas em solo contaminado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os isópodos utilizados nos testes vieram de uma fazenda em Simões Filho, Bahia, sendo mantidos por várias gerações em laboratório há cerca de dois anos. O solo utilizado foi o mesmo dos cultivos dos isópodos no laboratório, oriundo do Centro de Mandioca e Fruticultura – EMBRAPA (Cruz das Almas). O solo foi estocado em sacos plásticos, mantido no laboratório e peneirado antes do uso.

Para observação de efeitos subletais do glifosato em *C. murina* e também da sobrevivência desses isópodos, as seguintes concentrações nominais iniciais foram utilizadas: controle (solo com água destilada), C1 (4,8 mg glifosato/g solo), C2 (9,6 mg glifosato/g solo), C3 (14,4 mg glifosato/g solo) e C4 (19,2 mg glifosato/g solo). Para obter a concentração nominal inicial desejada de glifosato no solo, as porções de solo foram peneiradas e pesadas. Após, foram contaminadas com soluções preparadas a partir do herbicida Roundup® e água destilada. A concentração nominal de glifosato no Roundup® é de 480 g/L.

Recipientes plásticos de 14 × 10 cm e 4 cm de altura receberam 1 cm de solo do respectivo tratamento. Dez organismos, com idade entre dois e quatro dias de vida, foram distribuídos aleatoriamente entre as quatro réplicas de cada tratamento. Utilizaram-se filhotes por se acreditar que nessa fase os indivíduos são mais sensíveis do que na fase adulta.

Os tratamentos receberam borrifadas diárias de água destilada para manter a umidade mínima necessária à sobrevivência dos isópodos. A principal fonte de alimento foi o próprio substrato, porque apenas semanalmente foi adicionada ração AlconBasic® ao teste para complementar a alimentação.

Após completar as cinco semanas, todos os indivíduos foram contados e pesados, e a média de peso dos indivíduos de cada concentração foi comparada ao controle e aos demais tratamentos, através da utilização da ANOVA, para verificar se as diferenças entre as médias de peso foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Devido à não homogeneidade das amostras,

apontada pelo teste de Bartlett, foi utilizada ANOVA não paramétrica com o teste de comparações múltiplas de Dunn (Zar, 1996). Animais que morreram durante o experimento foram excluídos dos dados de peso, sendo a análise restrita aos animais que sobreviveram durante todo o experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a pesagem dos indivíduos após cinco semanas nos diferentes tratamentos, pôde-se observar os efeitos do glifosato sobre o peso médio dos isópodos (Figura 1). Em todos os tratamentos, o peso médio foi menor do que no controle. Porém, apenas nas concentrações C3 e C4, que continham 14,4 e 19,2 mg gli/g solo, respectivamente, as diferenças em relação ao controle foram significativamente diferentes ($p < 0,001$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) também foram encontradas ao comparar essas concentrações com C1 e C2, que continham 4,8 e 9,6 mg gli/g solo, respectivamente. O experimento foi realizado duas vezes, e as mesmas diferenças foram encontradas.

A redução no crescimento pode ser resultado de evitação ao alimento (neste caso, ao substrato, que também serviu de alimento), conforme Vink *et al.* (1995), que constataram redução no consumo de alimento contaminado com pesticidas por *Porcellionides pruinosus*, através da quantidade de fezes gerada. Sugere-se que a palatabilidade do alimento possa ser afetada pelo pesticida.

Porém, a inanição pode não ser a única razão da redução do crescimento. Pode ter havido a ingestão do substrato contaminado ou, como sugerido por Fischer *et al.* (1997), pode haver a absorção do contaminante do substrato através da cutícula do isópodo. Donker (1992) sugere que os organismos usam energia para resistir ao contaminante, deixando menos

energia para o crescimento, podendo, assim, resistir por meio de evitação e/ou detoxificação, e ambos utilizam energia.

As variações de peso dos isópodos dentro de um mesmo tratamento e no controle refletem que a taxa de crescimento é muito variável mesmo entre os indivíduos de uma mesma espécie e com a mesma idade, como indicado por Drobne (1997), Odendaal & Reinecke (1999) e Staak *et al.* (1998).

Houve grande mortalidade no controle (Figura 2), e é bem provável que isso se deva à taxa normal de mortalidade entre os filhotes, já que foram utilizados organismos com idade entre dois e quatro dias de vida. A literatura sobre o assunto cita grande mortalidade entre os filhotes no primeiro mês de vida fora do marsúpio (Warburg, 1993).

A partir dos resultados apresentados, foi possível constatar que a biomassa, após exposição prolongada em concentrações subletais, foi um *alvo fisiológico* bastante sensível ao glifosato, em relação aos testes agudos de curta duração. Todos os tratamentos apresentaram crescente diminuição do peso médio dos indivíduos à medida que a concentração do glifosato era maior no solo. Porém, diferenças significativas em relação ao controle foram encontradas apenas para as concentrações C3 e C4, contendo 14,4 e 19,2 mg gli/g solo, respectivamente; também apresentaram diferenças significativas em relação a C1 e C2 (4,8 e 9,6 mg gli/g solo, respectivamente).

Como houve grande mortalidade no controle (30%), recomenda-se a realização de ensaios com isópodos de mais idade, buscando-se evitar a mortalidade comum entre os filhotes.

Acredita-se que a biomassa seja um *alvo fisiológico* mais adequado para avaliação dos efeitos do glifosato em ensaios de longa duração com *Cubaris murina* do que a sobrevivência, apesar das variações de peso encontradas dentro dos tratamentos e já discutidas na literatura.

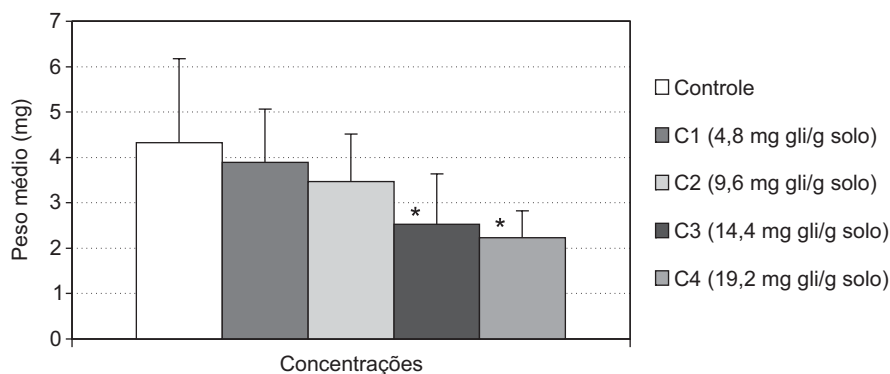


Figura 1 — Peso médio dos indivíduos, após cinco semanas, nos diferentes tratamentos com glifosato. As barras indicam o desvio-padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,001$) e em relação a C1 e C2 ($p < 0,05$).

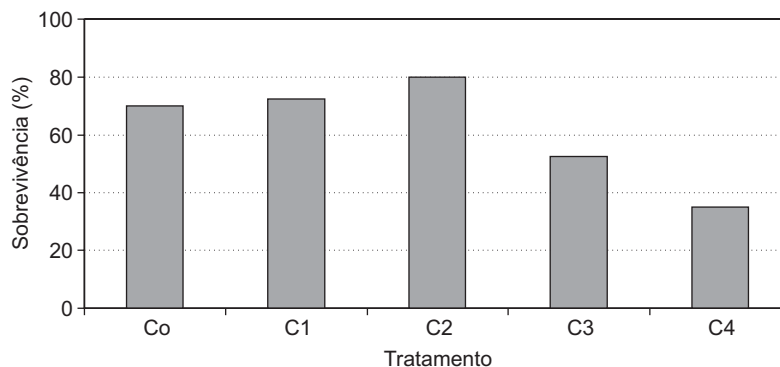


Figura 2 — Porcentagem de sobrevivência dos isópodos após 5 semanas nos diferentes tratamentos: Co (controle), C1 (4,8 mg gli/g solo), C2 (9,6 mg gli/g solo), C3 (14,4 mg gli/g solo) e C4 (19,2 mg gli/g solo).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DONKER, M. H., 1992, Energy reserves and distribution of metals in populations of the isopod *Porcellio scaber* from metal-polluted sites. *Funct. Ecol.*, 6: 445-454.
- DROBNE, D., 1997, Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(6): 1159-1164.
- EIJSACKERS, H., 1991, Litter fragmentation by isopods as affected by herbicide application. *Netherlands Journal of Zoology*, 41(4): 277-303.
- FISCHER, E., FARKAS, S., HORNING, E. & PAST, T., 1997, Sublethal effects of an organophosphorous insecticide, dimethoate, on the isopod *Porcellio scaber* Latr. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116C(2): 161-166.
- KHALIL, M. A., DONKER, M. H. & VAN STRAALLEN, N. M. 1995. Long-term and short-term changes in the energy budget of *Porcellio scaber* Latreille (Crustacea) exposed to cadmium polluted food. *Eur. J. Soil Biol.*, 31(3): 163-172.
- MOHAMED, A. I., NAIR, G. A., ABBAS, H. L. & KASSAM, H. H., 1992, Effects of pesticides on the survival, growth and oxygen consumption of *Hemilepistus reaumuri* (Audouin & Savigny 1826) (Isopoda Oniscidea). *Tropical Zoology*, 5: 145-153.
- NIEMEYER, J. C., 2004, Aspectos biológicos de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) em laboratório e seu uso em Ecotoxicologia: estudo da sensibilidade ao Glifosato. Dissertação de Mestrado, Ecologia e Biomonitoramento, Universidade Federal da Bahia.
- ODENDAAL, J. P. & REINECKE, A. J., 1999, The toxicity of sublethal lead concentrations for the woodlouse, *Porcellio laevis* (Crustacea, Isopoda). *Biol. Fertil Soils*, 29: 146-151.
- STAAK, A., FROST, M. & KRATZ, W., 1998, Ecotoxicological studies on the impact of the herbicide trifluralin on *Porcellio scaber* (Isopoda). *Applied Soil Ecology*, 9: 405-409.
- VINK, K., DEWI, L., BEDAUX, J. & TOMPOT, A., 1995, The importance of the exposure route when testing the toxicity of pesticides to saprotrophic isopods. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(7): 1225-1232.
- ZAR, J. H., 1996, *Biostatistical analysis*. 3. ed. Prentice-Hall, Londres.
- WARBURG, M. R., 1993, *Evolutionary biology of land isopods*. Springer-Verlag, Germany.



SETAC - Brazil

Selênio em Tecidos de Organismos Marinhos da Baía de Guanabara, Brasil

T. G. SEIXAS,^{1*} H. A. KEHRIG,² I. MOREIRA¹ & O. MALM²

¹Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, CEP 22453-900, Rio de Janeiro

²Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21949-900, Rio de Janeiro

RESUMO

Neste estudo foram determinadas as concentrações de selênio total (TSe) no tecido muscular e no fígado de três espécies de peixes e, também, nos tecidos moles de uma espécie de bivalve. As amostras sofreram um tratamento ácido, e o TSe foi determinado por Absorção Atômica com forno de grafite (GF-AAS) equipado com corretor Zeeman. As concentrações de Se no tecido muscular foram mais elevadas no peixe carnívoro. O fígado foi o órgão que apresentou as maiores concentrações de Se para todas as espécies de peixe. Nos peixes, a concentração de Se no tecido muscular apresentou correlação significativa e positiva com o comprimento total. Os mexilhões apresentaram correlação significativa (Spearman) entre a concentração de Se nos tecidos moles e o índice de condição (IC). Todas as espécies estudadas apresentaram concentração de TSe no tecido muscular e nos tecidos moles dentro dos limites aceitáveis pela OMS (1,5 µg.g⁻¹ em peso úmido) para o consumo humano.

Palavras-chave: selênio total, peixes e mexilhão, Baía de Guanabara, hábito alimentar.

ABSTRACT

Selenium in tissues of marine organisms of Guanabara Bay, Brazil

This study assessed total selenium concentrations in the muscle tissues and liver samples of three fish species and also in the soft tissues of a bivalve. The samples were digested with concentrated acid and analyzed by GF-AAS using Zeeman background correction. Concentrations of selenium in the muscle tissue samples were higher in carnivorous fish. The liver samples of all studied fish species presented the highest total selenium concentration. The fish species presented a high positive correlation (Spearman) between their total lengths and total selenium concentration. A significant correlation was observed between the selenium concentration in the mussel soft tissues and the condition index (IC). All studied species presented the selenium concentrations in the muscle tissue and in the soft tissue below the safety limit established by WHO for human consumption (1.5 µg.g⁻¹ in wet weight).

Key words: total selenium, fish and mussel, Guanabara Bay, feeding habit.

INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é conhecido como um micronutriente essencial para a maioria dos animais, porém em concentrações elevadas é considerado tóxico (Chatterjee & Bhattacharya, 2001). Há grande interesse em entender o comportamento do Se nos organismos marinhos devido a sua importância fisiológica e toxicológica. São poucos os trabalhos dedicados ao metabolismo e à acumulação do Se no meio ambiente

aquático, e seu ciclo biogeoquímico é parcialmente conhecido (Pelletier, 1985). Alguns estudos relacionados ao metabolismo do Se nos produtores primários (Fries, 1982; Price *et al.*, 1987) e à acumulação do Se pelos consumidores (Fowler & Benayoun, 1976) forneceram algumas informações básicas a respeito da importância e do papel desse elemento para a biota marinha. Os bivalves e os peixes são reconhecidamente empregados como biomonitoradores de Se em ambientes aquáticos (Chatterjee & Bhattacharya, 2001). Peters *et al.* (1999) concluíram em

* Corresponding author: Tércia G. Seixas; e-mail: terciar@rdc.puc-rio.br.

seus estudos que a cadeia alimentar bentônica é uma importante fonte de Se para os peixes e que a principal rota para a bioacumulação é via cadeia alimentar. Porém, uma variedade de parâmetros abióticos e bióticos pode influir na eficiência com que os organismos aquáticos acumulam os metais pesados e o selênio em seus tecidos e órgãos (Reinfelder *et al.*, 1998). A concentração de Se nos detritos orgânicos dos sedimentos é mais importante para a contaminação da cadeia alimentar aquática do que a concentração de Se dissolvido na coluna d'água (Peters *et al.*, 1999). Estudos vêm mostrando que a contaminação dos sistemas aquáticos por Se pode causar sérios danos à biota, inclusive a mortalidade de peixes (Gillespie & Baumann, 1986).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações de selênio total no tecido muscular e no fígado de três espécies de peixes bentônicos com diferentes hábitos alimentares (*Mugil liza* – tainha, peixe planctívoro; *Bagre* spp. – bagre, peixe onívoro; e *Micropogonias furnieri* – corvina, peixe carnívoro) e nos tecidos moles de uma espécie de bivalve (*Perna perna*) coletados na Baía de Guanabara (22°S, 43°W, 400 km²), localizada no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figura 1).

Segundo a literatura científica, não são encontrados dados a respeito de selênio tanto no ambiente quanto nos organismos desse importante ecossistema brasileiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Durante os anos de 2000 e 2003, foram coletados, na Baía de Guanabara, 31 indivíduos de tainha (peixe planctívoro), 14 indivíduos de bagre (peixe onívoro), 34 indivíduos de corvina (peixe carnívoro) e 40 indivíduos de mexilhão (bivalve filtrador). Os mexilhões foram coletados em três pontos distintos: Marina da Glória (N = 10), Praia da Boa Viagem (N = 10) e Ponte Rio-Niterói (N = 20).

As amostras sofreram digestão ácida (HNO₃) a quente (Deaker & Maher, 1997) em sistema fechado. A concentração de Se total foi determinada por Absorção Atômica com Forno de Grafite (AAS ZEE nit 60, Analytic Jena) equipado

com corretor Zeeman de background, forno de grafite com plataforma PIN e um auto-amostrador AS52. O modificador químico empregado foi o Pd. A precisão e a exatidão do método analítico foram determinadas utilizando-se materiais certificados de referência fornecidos pelo National Research Council Canadá (DORM-2, tecido muscular) e pelo National Institute for Science and Technology (EUA, NIST 2976, tecidos moles de mexilhão). Os resultados obtidos para DORM-2 (N = 26) e NIST 2976 (N = 10) foram $1,39 \pm 0,23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. e $1,91 \pm 0,14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s., respectivamente. Sendo os valores certificados de $1,40 \pm 0,09 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. para o DORM-2 e $1,80 \pm 0,15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. para o NIST 2976. O limite de detecção (3σ) para o método foi de $1,00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, e a quantidade mínima de selênio determinada foi de $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Análise estatística

Após verificar a não normalidade na distribuição dos dados (teste W; $p = 0,00$), aplicaram-se, então, os testes não paramétricos: análise de variância (Kruskal-Wallis – ANOVA), para testar diferenças na concentração de Se entre as espécies, níveis tróficos e tecidos, e Mann-Whitney (Teste U), para comparar a concentração de selênio nos diversos tecidos dos organismos. Utilizou-se, também, a correlação de Spearman para verificar se há relação entre os parâmetros estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados na Tabela 1 e Figura 2.

As concentrações de Se (em peso úmido) no tecido muscular dos peixes se mostraram significativamente diferentes ($H = 31,90$; $p = 0,00$) e foram mais elevadas na corvina, peixe bentônico carnívoro.

Entretanto, essa espécie de peixe apresentou concentração de Se no fígado similar ($p = 0,88$) à encontrada no mesmo órgão da tainha e significativamente diferente à observada no fígado do bagre ($H = 17,46$; $p = 0,00$). O fígado dos peixes estudados foi o tecido que apresentou a maior concentração de Se quando comparado ao tecido muscular dos mesmos.

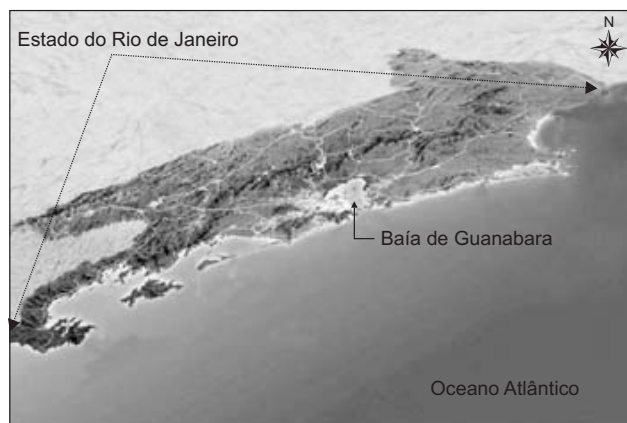
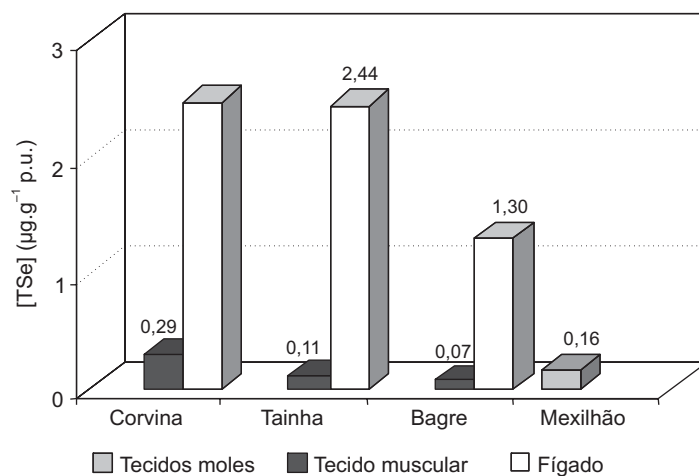


Figura 1 — Localização da Baía de Guanabara no Estado do Rio de Janeiro.

Tabela 1 — Medianas das concentrações de selênio total nos tecidos e órgãos dos organismos da Baía de Guanabara e seus parâmetros biológicos.

	<i>Micropogonias furnieri</i> (corvina)	<i>Bagre sp.</i> (bagre)	<i>Mugil liza</i> (tainha)	<i>Perna perna</i> (mexilhão)
Comprimento total médio (mm)	390 (340-580)	400 (320-540)	360 (290-500)	63 (45-80)
Peso médio (g)	750 (360-1900)	710 (330-1700)	560 (310-1620)	7,8 (2,69-14,95)
	(N = 34)	(N = 14)	(N = 31)	
Tecido muscular	0,29 (0,12-1,25)	0,07 (0,05-0,12)	0,11 (0,05-0,18)	—
	(N = 14)	(N = 14)	(N = 13)	
Fígado	2,47 (0,39-7,53)	1,30 (1,17-1,71)	2,44 (1,04-13,67)	—
				(N = 40)
Tecidos moles	—	—	—	0,16 (0,12-0,27)
Hábito alimentar	carnívoro	onívoro	plactívoro	filtrador

**Figura 2** — Medianas das concentrações de selênio nos tecidos dos organismos estudados.

O teste H de Kruskal-Wallis-ANOVA mostrou diferença significativa na bioacumulação de Se entre os tecidos ($H = 95,87$; $p = 0,00$).

Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis-ANOVA no conjunto de todos os dados com o intuito de verificar, entre o tecido muscular e o fígado dos peixes, qual deles sofre maior influência do hábito alimentar na acumulação de Se. Observou-

se que apenas o tecido muscular apresentou diferença significativa ($H = 31,90$; $p = 0,00$) entre as concentrações de Se nesse tecido e o hábito alimentar dos peixes. Esse fato indica, portanto, que esse tecido aparentemente é o único a ser influenciado pelo hábito alimentar. O fator que provavelmente mais influencia na acumulação de Se pelos organismos aquáticos parece ser sua exposição via água, sedimento e, principalmente,

alimento. Outros fatores que também podem influir são: a espécie de peixe, o hábito alimentar, a posição trófica, o comprimento, o peso e a idade (Besser *et al.*, 1996).

A mediana da concentração de Se obtida para os tecidos moles do mexilhão, 0,16 (0,12-0,27) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso úmido ou 0,71 (0,61-1,33) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso seco, foi similar àquelas encontradas por Baldwin & Maher (1997) (0,7-1,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso seco) e inferior àquelas encontradas em moluscos bivalves de ambientes relativamente não poluídos da Austrália, que variavam de 1,3 a 11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso seco (Lobel *et al.*, 1991), e em ambientes da costa indiana (3,94 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso seco) (Chatterjee & Bhattacharya, 2001). Porém, quando comparada às concentrações de Se encontradas nos peixes (Figura 2), esta se apresenta inferior àquelas encontradas no peixe carnívoro, contrariando, assim, a seqüência de acumulação de Se observada por outros autores na biota aquática, onde apresentaram que os bivalves acumularam mais selênio do que os peixes (Chatterjee & Bhattacharya, 2001). Tanto nos peixes quanto nos mexilhões, as concentrações de Se encontradas nos tecidos apresentaram-se abaixo do limite recomendável pela OMS (1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso úmido) para o consumo humano e também apresentaram-se menores e dentro de uma variação habitual quando comparadas às concentrações naturais reportadas em estudos anteriores.

Na Tabela 2 são apresentadas as correlações testadas entre os comprimentos totais (L) e a concentração de Se nos tecidos dos organismos estudados.

Foram observadas correlações significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de Se no tecido muscular e o comprimento total (L) da corvina e tainha; onde as concentrações apresentaram tendência positiva (Tabela 2). Esses resultados mostraram-se perfeitamente coerentes, uma vez que, com o aumento do comprimento, há o aumento da idade do peixe e, conseqüentemente, o aumento do tempo de exposição do organismo ao Se, através do ambiente em que ele vive e também do alimento. Mackay *et al.* (1975) encontraram relações significativas entre as concentrações de Se e o L no tecido muscular e no fígado de peixes (marlim-negro).

Os mexilhões apresentaram correlação significativa e positiva entre a concentração de Se e o IC. O índice de condição (IC) é um parâmetro utilizado na normalização de dados de acumulação de metais pesados em bivalves (Joiris *et al.*, 2000), pois, através deste pode-se excluir diferenças individuais como tamanho, massa, estágio de vida e ciclo sexual que são efeitos importantes no processo de bioacumulação de metais-traço em mexilhões (Wang, 1987; Cossa, 1989). O teste H de Kruskal-Wallis-ANOVA mostrou diferença significativa na concentração de Se nos tecidos moles dos mexilhões, entre os diferentes locais de coleta na Baía de Guanabara (praia de Boa Viagem, Marina da Glória e Ponte Rio-Niterói) ($H = 5,96$; $p = 0,05$). Indicando, assim, que provavelmente podem existir lançamentos antrópicos desse elemento na Baía de Guanabara, porém essas concentrações são semelhantes às encontradas em ambientes considerados naturais (Lobel *et al.*, 1991; Baldwin & Maher, 1997; Chatterjee & Bhattacharya, 2001).

Tabela 2 — Resultados das análises de regressão linear simples para as concentrações de selênio nos tecidos úmidos dos organismos da Baía de Guanabara e seus comprimentos totais (L).

Tecido	Espécie	Equação de regressão	
Tecido muscular	<i>M. furnieri</i> (N = 34)	[SeT] = 0,041L - 1,251	R = 0,84; p = 0,00**
	<i>Bagre</i> spp. (N = 14)	[SeT] = 0,046L + 0,0005	R = 0,15; p = 0,61 ns
	<i>M. liza</i> (N = 31)	[SeT] = 0,006L - 0,099	R = 0,64; p = 1×10^{-4} **
Fígado	<i>M. furnieri</i> (N = 14)	[SeT] = 0,242L - 5,304	R = 0,28; p = 0,34 ns
	<i>Bagre</i> spp. (N = 14)	[SeT] = 0,007L + 1,057	R = 0,26; p = 0,37 ns
Tecidos moles	<i>M. liza</i> (N = 13)	[SeT] = -0,559L + 21,270	R = -0,29; p = 0,33 ns
	<i>P. perna</i> (N = 40)	[SeT] = 2,25IC ^a - 0,079	R = 0,91; p = 5×10^{-4} **

(ns) – correlação não significativa; (*) – correlação significativa ($p \geq 0,05$); (**) – correlação altamente significativa ($p \ll 0,001$).

^aIC = ((massa de tecidos moles (g))/(comprimento da concha (mm))). O IC foi utilizado para normalizar os dados, uma vez que existia uma diferença grande de tamanho entre os indivíduos coletados na Ponte Rio-Niterói (Joiris *et al.*, 2000).

CONCLUSÕES

Há uma tendência do Se em se acumular em órgãos com atividade metabólica muito intensa (fígado), e esta pode não ser influenciada pelo hábito alimentar, mas sim pelo modo de incorporação do Se (via dieta ou água). A acumulação de Se no tecido muscular parece ser a única que sofre influência direta do hábito alimentar. Esta tende a aumentar com o tempo de exposição do organismo ao ambiente. As concentrações de Se encontradas nos organismos estudados apresentaram-se inferiores aos níveis recomendados pela OMS para o consumo humano ($1,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.u.). Sendo assim, estes, que são uma importante fonte de proteína animal de origem marinha de Se e vitamina E, devem continuar a fazer parte da alimentação da população humana. A Baía de Guanabara parece ser um ambiente não poluído por Se, uma vez que as concentrações encontradas nos tecidos dos organismos foram baixas se comparadas às observadas em outros ecossistemas considerados não poluídos. Porém, muito ainda tem de se estudar para entender o comportamento do Se nos organismos aquáticos e o meio ambiente.

Agradecimentos — Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pela CAPES, CNPq e FAPERJ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, S. & MAHER, W., 1997, Spatial and temporal variation of selenium concentration in five species of intertidal molluscs from Jervis Bay, Australia. *Mar. Environ. Res.*, 44(3): 243-262.
- BESSER, J. M., GIESY, J. P., BROWN, R. W., BUELL, J. M. & DAWSON, G. A., 1996, Selenium bioaccumulation and hazards in a fish community affected by coal fly ash effluent. *Ecotoxcol. and Environ. Safety*, 35: 7-15.
- CHATTERJEE, A. & BHATTACHARYA, B., 2001, Temporal and organ-specific variability of selenium in marine organisms from the eastern coast of India. *Adv. Environ. Res.*, 5: 167-174.
- COSSA, D., 1989, A review of the *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanologica Acta*, 12(4): 417-432.
- DEAKER, M. & MAHER, W., 1997, Low volume microwave digestion for the determination of selenium in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 350: 287-294.
- FOWLER, S. W. & BENAYOUN, G., 1976, Accumulation and distribution of selenium in mussel and shrimp tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 16: 339-346.
- FRIES, L., 1982, Selenium stimulated growth of marine macroalgae in axenic culture. *J. Phycol.*, 18: 328-331.
- GILLESPIE, R. B. & BAUMANN, P. C., 1986, Effects of high tissue concentrations of selenium on reproduction by bluegills. *Transac. Am. Fish. Soc.*, 115: 208-213.
- JOIRIS, C. R., HOLSBEEK, L. & OTCHERE, F. A., 2000, Mercury in the Bivalves *Crassoatrea tulipa* and *Perna perna* from Ghana. *Mar. Poll.*, 40(5): 457-460.
- LOBEL, P. B., LOGERICH, H. P., JACKSON, S. E. & BELKHODE, S. P., 1991, A major factor contributing to the high degree of unexplained variability of some elements concentrations in biological tissue: 27 elements in 5 organs of the mussel *Mytilus edulis* as a model. *Arc. Environ. Cont. and Toxicol.*, 21: 118-125.
- MACKAY, N. J., KASACOS, M. N., WILLIAMNS, R. J. & LEEDOW, M. I., 1975, Selenium and heavy metals in black marlin. *Mar. Poll. Bull.*, 6: 57-61.
- PELLETIER, E., 1985, Mercury-selenium interactions in aquatic organisms: a review. *Mar. Environ. Res.*, 18: 111-132.
- PETERS, G. M., MAHER, W. A., KRIKOVA, F., ROACH, A. C., JESWANI, H. K., BARFORD, J. P., GOMES, V. G. & REIBLE, D. D., 1999, Selenium in sediments, pore water and benthic infauna of Lake Macquarie, New South Wales, Australia. *Mar. Environ. Res.*, 47: 491-508.
- PRICE, N. M., THOMPSON, P. A. & HARRISON, P. J., 1987, Selenium an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudomona* (acillariophyceae). *J. Phycol.*, 23: 1-9.
- REINDFELDER, J. R., FISHER, N. S., LUOMA, S. N., NICHOLS, J. W. & WANG, W. X., 1998, Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. *The Science of the Total Environ.*, 219: 117-135.
- WANG, W., 1987, Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms- overview. *Environ. Inter.*, 13: 437-457.

Estudo de Alterações na Concentração dos Íons Plasmáticos e da Indução de Micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* Exposto ao Herbicida Atrazina

S. E. MORON,^{1*} V. L. P. POLEZ,² R. F. ARTONI,³ J. L. C. RIBAS³ & H. K. TAKAHASHI⁴

¹Universidade Federal do Tocantins – UFT

²Universidade Brasília – UNB

³Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

⁴Universidade Oeste Paulista – UNOESTE

RESUMO

A poluição dos ecossistemas aquáticos tem aumentado nos últimos anos, principalmente em razão do desenvolvimento industrial e agrícola. O agrotóxico atrazina é um importante agente poluente e pode prejudicar o desenvolvimento e reprodução de várias espécies de peixes devido a sua toxicidade. *Piaractus mesopotamicus* (pacu) é uma das espécies amplamente comercializadas e utilizadas em pisciculturas. O presente estudo analisou possíveis modificações na concentração dos íons plasmáticos (Na⁺, Cl⁻, K⁺, Ca²⁺), no pH sanguíneo e na frequência de micronúcleos em eritrócitos de pacu (N = 10 por grupo; Wt: 160,0 ± 5 g) exposto ao herbicida atrazina (0,1 mg/L) durante 96 horas em sistema semi-estático. Amostras de sangue foram coletadas, com auxílio de seringas heparinizadas, sendo posteriormente centrifugadas e/ou feitos esfregaços para posterior análise dos micronúcleos. O plasma obtido foi usado para as determinações dos íons plasmáticos. Análises citológicas mostraram diferenças significativas (p < 0,0001) na frequência de micronúcleo entre o grupo controle e exposto ao herbicida atrazina. O pH sanguíneo permaneceu constante, mas a concentração plasmática dos íons Na⁺ e Cl⁻ reduziu-se significativamente (p < 0,05) em relação ao controle. A concentração testada do herbicida provavelmente provocou distúrbios no balanço iônico e equilíbrio ácido-base e também pode ser considerado como um produto tóxico e clastogênico.

Palavras-chave: micronúcleos, herbicida, íons plasmáticos, *Piaractus mesopotamicus*.

ABSTRACT

Study of alterations in the concentration of ions in the plasma and of the induction of micronucleus in *Piaractus mesopotamicus* exposed to the herbicide atrazine

The pollution of the aquatic ecosystem has been increasing in the last years, mainly due to the industrial and agricultural development. The Atrazine pesticide is an important agent pollutant and it can harm the development and reproduction of several species of fish due to its toxicity. *Piaractus mesopotamicus* (pacu) is one of the species thoroughly commercialized and used in fish farms. The present study analyzed possible modifications in the concentration of ions in the plasma (Na⁺, Cl⁻, K⁺, Ca²⁺), in the blood pH and in the micronucleus frequency in pacu erythrocytes (N = 10 for group; Wt: 160.0 ± 5 g) exposed to the Atrazine herbicide (0.1 mg/L) during 96 hours in semi-static system. Samples of blood were collected, with aid of syringes heparinized, being centrifuged later and/or made smears for subsequent analysis of the micronucleus. The obtained plasma was used for the determinations of ions in the plasma. Cytological analyses showed significant differences (p < 0.0001) in the micronucleus frequency among the control group which was exposed to the atrazine herbicide. The blood pH stayed constant, but the ions concentration in the plasma Na⁺ and Cl⁻ was, in relation to the control, significantly reduced (p < 0.05). The tested concentration of the herbicide probably provoked disturbances in the acid-base ionic balance and it can also be considered a clastogenic and poisonous product.

Key words: micronucleus, herbicide, plasma ions, *Piaractus mesopotamicus*.

*Corresponding author: Sandro Estevan Moron, e-mail: sandromoron@uol.com.br.

INTRODUÇÃO

Desde a evolução industrial, o homem está contaminando o ambiente com produtos químicos, considerados tóxicos para a maioria dos organismos que habitam tanto ecossistemas terrestres como aquáticos. Com o desenvolvimento da tecnologia, diferentes grupos de substâncias passaram a ter efeitos sobre o equilíbrio natural dos ecossistemas aquáticos: nutrientes em excesso, aromáticos policíclicos, material radioativo, metais pesados e agrotóxicos. As atividades agrícolas também estão sendo reconhecidas como causadoras de alterações ambientais, e os agrotóxicos são importantes agentes impactantes do ambiente. No ecossistema, a presença desses poluentes pode provocar danos irreversíveis, como, por exemplo, a extinção de espécies em rios e lagos (Cairns, 1980; Van Der Werf, 1996). No caso das pisciculturas que utilizam águas contaminadas, as espécies também estão suscetíveis aos efeitos desses xenobióticos. O atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamina-s-triazina) é um herbicida triazínico seletivo amplamente utilizado no controle de ervas daninhas, gramíneas em áreas agrícolas e industriais e vegetação submersa em águas estagnadas ou pouco correntes, como em tanques de pisciculturas (Solomon *et al.*, 1996). No Brasil, esse herbicida é muito utilizado nas culturas de cana-de-açúcar e milho, sendo considerado um contaminante potencial em virtude de apresentar hidrólise lenta e baixa solubilidade em água (Eiler, 1989; Lanchote *et al.*, 2001).

Efeitos tóxicos resultam em alterações bioquímicas e fisiológicas no sangue dos peixes, podendo ser indicadoras do seu estado fisiológico (Heath, 1995; Nussey *et al.*, 1995). Nos últimos anos tem aumentado o interesse na área da genotoxicidade causada pela poluição ambiental. Os peixes se constituem em um dos modelos para monitoramento genotóxico aquático pela habilidade de metabolizar xenobióticos e, em alguns casos, apresentarem acúmulo de poluentes. O teste de micronúcleo tem sido utilizado para análise de toxicidade genética em várias espécies de peixes (De Flora *et al.*, 1993; Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Grisolia & Cordeiro, 2000), entretanto, é pouco explorado em peixes neotropicais (Ferraro *et al.*, 2003).

Piaractus mesopotamicus possui grande interesse comercial, sendo uma das espécies mais exploradas na piscicultura. Neste caso, considerando o aumento da contaminação por agrotóxicos, particularmente os herbicidas, no ambiente aquático, o presente trabalho se propôs a analisar a ação do herbicida atrazina no equilíbrio iônico e o seu possível potencial clastogênico em *Piaractus mesopotamicus*.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Piaractus mesopotamicus (Wt: $160,0 \pm 5$ g) provenientes da estação de piscicultura da Universidade Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em tanques (1.000 L) com aeração e fluxo de água contínuo durante 30 dias para aclimação às condições do laboratório. O fotoperíodo foi de 12 horas luz. Alimentação foi suspensa 24 horas antes da realização dos experimentos.

Protocolo experimental

Os espécimes foram separados em 2 grupos (controle e exposto ao herbicida atrazina 0,01 mg/L), contendo 10 exemplares em cada aquário de 170 L, durante 96 horas, em sistema semi-estático. O número de espécimes não ultrapassou o máximo de 1 g peixe L^{-1} de água, e durante o experimento os animais (controle e exposto ao herbicida) permaneceram em jejum. Os aquários foram revestidos para que não houvesse contato visual dos animais com o meio externo durante o período experimental. Após o período de exposição, os animais foram anestesiados com 0,01% de benzocaína, e amostras de sangue foram coletadas com auxílio de seringas heparinizadas. O teste do micronúcleo seguiu basicamente a metodologia descrita por Grisolia & Cordeiro (2000). O sangue obtido foi utilizado para a distensão sangüínea em lâmina. Após secas, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e coradas com Giemsa 5% por 5 minutos. Foi realizada análise em teste cego, ao microscópio de luz transmitida, com 1.000 células por animal para a contagem de micronúcleos em eritrócitos. Foram consideradas apenas hemácias nucleadas com membranas nucleares e citoplasmáticas intactas. Os micronúcleos foram considerados os corpúsculos que em relação ao núcleo apresentaram aproximadamente 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refração.

Imediatamente após a coleta de sangue, o pH sangüíneo foi mensurado em pHmetro QUIMIS. Amostras de plasma foram obtidas por centrifugação (3.000 rpm, durante 3 minutos) do sangue para análise dos íons plasmáticos (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) em um aparelho Omni Modular System AVL.

Análises estatísticas

Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média. Diferença estatisticamente significativa entre os valores dos animais expostos ao herbicida em relação ao controle foi detectada por meio de análise de variância one-way ANOVA seguida pelo teste t-teste de comparações múltiplas

de Bonferroni. Diferença significativa foi considerada quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alterações comportamentais foram observadas nos espécimes expostos ao herbicida, como excitabilidade e perda de equilíbrio.

Métodos citogenéticos estão entre os mais sensitivos e eficientes para detecção de efeitos genotóxicos (Belpaeme *et al.*, 1996). Em peixes, a técnica de micronúcleos é usualmente baseada nos eritrócitos, que nesses organismos são nucleados (Al-Sabi & Metcalfe, 1995). Análises citológicas mostraram diferenças significativas ($p < 0,0001$) na frequência de micronúcleo entre o grupo controle e o exposto ao herbicida atrazina (0,01 mg/L; Tabela 1). O número de micronúcleos nas células de peixes pode ser variável, e alguns trabalhos relatam diferenças naturais no número de micronúcleos em algumas espécies (Gustavino *et al.*, 2001). Muito provavelmente essas variações sejam um reflexo direto da sensibilidade, do comportamento e do nicho de cada espécie. Embora alguns autores sugiram variações no modelo, o teste de micronúcleos em peixes pode representar uma alternativa para detecção da genotoxicidade (Hose *et al.*, 1987; Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000).

A exposição ao herbicida induziu ao distúrbio iônico em *P. mesopotamicus*, mas não provocou alteração no pH sanguíneo (média = 7,7) nas condições experimentadas. A concentração plasmática dos íons Na^+ e Cl^- reduziu-se significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle (Tabela 2). Muitos agentes

estressores podem causar distúrbios hidromineral e ácido-base (Barton *et al.*, 1991).

Em peixes de água doce, o aumento na perfusão das lamelas secundárias das brânquias favorece a tomada de oxigênio e é acompanhado por aumento na permeabilidade das membranas, favorecendo o ganho de água a partir do ambiente e a perda de íons Na^+ e Cl^- para o ambiente (McDonald & Milligan, 1997). Vários estudos relacionam a redução dos íons Na^+ e Cl^- plasmático nos peixes à redução da atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e a modificações bioquímicas relacionadas com potenciais transepiteliais (Laurent & Hebibi, 1989; Bury *et al.*, 1998; Pinheiro, 2004). Alterações no epitélio branquial podem induzir a um aumento no efluxo passivo de Na^+ e Cl^- do meio extracelular para o meio aquático devido ao aumento da permeabilidade das membranas (Lauren & McDonald, 1985). As células-cloreto, localizadas no epitélio branquial, estão envolvidas na absorção ativa de íons Na^+ e Cl^- em peixes de água doce. A hipotrofia dessas células e a diminuição de sua superfície apical podem prejudicar a manutenção do equilíbrio iônico (Perry *et al.*, 1992).

Em conclusão, as alterações nas frequências dos micronúcleos mostraram que esse herbicida apresenta características clastogênicas, podendo induzir a eventos mutagênicos nessa espécie. Distúrbio na regulação iônica pode estar relacionado com o efeito direto do atrazina no tecido branquial e provavelmente com a permeabilidade das membranas celulares.

Agradecimentos — Os autores agradecem a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – UNOESTE, pelo suporte financeiro.

Tabela 1 — Comparação entre a contagem de micronúcleos em *P. mesopotamicus*.

	Total	Média	S.E.M.
Controle	10	1,1	0,27
Herbicida (0,01 mg/L)	10	11,7*	0,53

S.E.M = \pm erro-padrão da média. * = diferenças significativas ($p < 0,0001$).

Tabela 2 — Concentração de íons plasmáticos em *P. mesopotamicus*.

Íons	Controle	Exposição herbicida
Na^+	150,6 \pm 3,13	143,2 \pm 2,16*
Cl^-	134,5 \pm 0,87	123,8 \pm 1,32*
K^+	4,2 \pm 0,13	4,1 \pm 0,17
Ca^{2+}	1,2 \pm 0,13	1,0 \pm 0,01

Média \pm erro-padrão da média. * = diferenças significativas ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABTI, K. & METACALFE, C. D., 1995, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mut. Res.*, 323: 121-135.
- AYLLON, F. & GARCIA-VAZQUEZ, E., 2000, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.*, 467: 177-186.
- BARTON, B. A. & IWAMA, G. K., 1991, Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.
- BELPAEME, K., DELBEKE, K., ZHU, L. & KIRSCH-VOLDERS, M., 1996, Cytogenetic studies of PCB 77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 11: 485-492.
- BURY, N. R., LI, J., LOCK, R. A. C. & WENDELAAR BONGA, S. E., 1998, Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. *Aquat. Toxicol.*, 40: 193-202.
- CAIRNS, Jr. J., 1980, Estimating hazard. *Bioscience*, 30(2): 101-107.
- De FLORA, S., VIGARIO, L., D'AGOSTINI, F., CAMOIRANO, A., BAGNASCO, M., BENNECELLI, C., MELODIA, F. & ARILLO, A., 1993, Multiple biomarkers in fish exposed in situ polluted river water. *Mutat. Res.*, 319: 167-177.
- EILER, R., 1989, Atrazina hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *Contam. Hazard Review*, 18: 1-55.
- FERRARO, M. V. M., FENOCCHIO, A. S., MANTOVANI, M. S., RIBEIRO, C. O. & CESTARI, M. M., 2004, Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay, and the piscine micronucleus and chromosome aberrations tests. *Genetics and Mol. Biol.*, 27: 103-107.
- GRISOLIA, C. K. & CORDEIRO, C. M. T., 2000, Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet. Mol. Biol.*, 23(1): 235-239.
- GUSTAVINO, B., SCORNAJENGI, K. A., MINISSI, S. & CICCOTTI, E., 2001, Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-ray and colchicines. *Mutat. Res.*, 494: 151-159.
- HEATH, A. G., 1995, *Water pollution and fish physiology*. London CRC Press, New York, 359 p.
- HOSE, J. E., CROSS, J. N., SMITH, S. G. & DIEHL, D., 1987, Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated of southern California. *Mar. Environ Res.*, 22: 167-176.
- LANCHOTE, V. L., SPADOTTO, C. A. & GOMES, M. A. F., 2001, Ocorrência do herbicida tebuthiuron na água subterrânea da microbacia do córrego Espreado, Ribeirão Preto, SP. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. Meio Ambiente*, 11: 66-76.
- LAUREN, D. J. & McDONALD, D. G., 1985, Effects of copper on branquial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Comp. Physiol.*, 13: 635-644.
- LAURENT, P. & HEBIBI, N., 1989, Gill morphometry and fish osmoregulation. *Can. J. Zool.*, 67: 3055-3063.
- McDONALD, D. G. & MILLIGAN, L., 1997, Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter & C. B. Scheck (eds.), *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 119-144.
- PERRY, S. F., GOSS, G. G. & LAURENT, P., 1992, The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.*, 70: 1775-1786.
- PINHEIRO, G. H. D., 2004, *Respostas fisiológicas ao estresse em Prochilodus scrofa durante a exposição ao cobre e subsequente recuperação em água sem cobre*. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- NUSSEY, G., VAN VUREN, J. H. J. & DU PREEZ, H. H., 1995, Effect of copper on haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 111(C): 369-380.
- SOLOMON, K. R., BAKER, D. B., RICHARDS, R. P., DIXON, K. R., KLAINE, S. J., LA POINT, T. W., KENDALL, J., WEISSKOPF, C. P., GIDDINGS, J. M., GIESY, J. P., MAY, L. W. & WILLIAMS, W. M., 1996, Ecological risk assesment to atrazine in North American surface water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 31-76.
- VAN der WERF, M. G., 1996, Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agricul. Ecosy. Environ.*, 60: 81-96.



N. 6 Fuel Oil Effects on Antioxidant Enzymes and Immunological Responses in the Fish

Thalassophryne maculosa (Pisces: Batrochoididae)

L. MARCANO,* O. NUSETTI, E. ZAPATA-VÍVENES, S. NUSETTI & M. M. ESCLAPÉS

Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná-Venezuela

ABSTRACT

With the aim of investigate the acute effects of two concentrations (25 and 100%) of N. 6 fuel oil-water-accommodated fraction (OWAF) on antioxidant enzyme activities and immunological responses, fishes *Thalassophryne maculosa* were sampled from the La Restiga Lagoon, Margarita island, in eastern Venezuela. The antioxidant enzymes, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST) were measured in liver and gills. The macrophagic phagocytosis and antibacterial lysozyme activity of anterior kidney were the immune parameters examined. Increases in gill GST activity and hepatic GR activity were observed after the exposure to 25 and 100% OWAF, respectively. GPX, CAT and immune responses were not affected by the experimental treatments. Our results demonstrated that among the antioxidant enzymes tested, GR and GST activities were the most sensible to the acute treatment with fuel oil, indicating changes in the redox cellular state that may result in oxidative stress in *T. maculosa*.

Key words: antioxidant enzymes, immunological responses, fuel oil, *T. maculosa*.

RESUMO

Efeitos do óleo combustível N. 6 sobre as enzimas antioxidantes e respostas imunológicas em peixe *Thalassophryne maculosa* (Pisces: Batrochoididae)

Com o objetivo de investigar os efeitos agudos de duas concentrações (25% e 100%) de fração óleo-água (OWAF) de óleo combustível N. 6 em atividades de enzima antioxidante e as respostas imunológicas, foram coletados peixes *Thalassophryne maculosa* da Lagoa de La Restiga, Ilha de Margarita, Venezuela. As enzimas antioxidantes, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) e glutathione-S-transferase (GST) foram medidas no fígado e nas brânquias. A atividade de fagocitose macrofágica e antibacteriana dos lisossomos foram as respostas imunológicas examinadas. Os aumentos na atividade da brânquia GST e na atividade hepática de GR foram observados após a exposição a 25% e a 100% de OWAF, respectivamente. GPX, CAT e as respostas imunológicas não foram afetadas pelos tratamentos. Os resultados demonstraram que entre as enzimas antioxidantes testadas, as atividades de GR e GST foram as mais sensíveis ao tratamento agudo com o óleo combustível, indicando mudança no redox celular, que pode resultar no estresse oxidativo em *T. maculosa*.

Key words: enzimas antioxidantes, respostas imunológicas, óleo combustível, *T. maculosa*.

INTRODUCTION

Aquatic life is currently being exposed to chemical contamination by increasing variety of anthropogenic activities that can induce many different mechanism of toxicity, each contributing to varying degrees of deleterious effects (Correia *et al.*, 2003). Consequently, in environmental disturbance assessment, the integration of chemical data with biological responses (so-called biomarkers) is strongly recommended in

order to assess effects of pollutants on the organisms (Besten *et al.*, 1998; Cajaraville *et al.*, 2000).

Many studies showed that oxidative stress may be a common pathway of toxicity, induced by several contaminants, often through metabolic activation, rendering organisms susceptible to environmental stressors (Viarengo *et al.*, 1991; Di Giulio *et al.*, 1995; Solé *et al.*, 1995a; Livingstone *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2004). Among the chemicals that may cause a rise in the production of reactive oxygen species (ROS) are

*Corresponding author: Leida Marcano, e-mail: leimar@sucre.udo.edu.ve.

quinones, bipyridyls, aromatic nitrocompounds, hydroxylamines and heavy metal which can react and damage cellular macromolecules (Stephensen *et al.*, 2002). A key mechanism by which these compounds enhance cellular production of oxygen radicals is referred to as redox cycling (Di Giulio *et al.*, 1995). To minimize oxidative damage to cellular components produced by xenobiotics, organisms have developed antioxidant enzymatic defense systems: superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), converts superoxide anion to hydrogen peroxide, which is subsequently detoxified by catalase (CAT, EC 1.11.1.6) or glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9). Glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) catalyzes conjugation reactions with reduced glutathione (GSH) being the most important phase II enzyme and, glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) contribute to the maintenance of cellular redox state (Cavaletto *et al.*, 2002).

Recent studies for toxicological assessments have also considered the immune system as a target of toxicant insult after exposure to some chemical compounds. The immune defense mechanisms are important for studying toxic effects of chemical exposure which may result in increased host susceptibility to disease (Anderson & Zeeman, 1995). The immunity of aquatic organisms could be adversely affected by development of oxidative stress associated with xenobiotic pollution, and hence decrease the fitness of natural populations. In this sense, the potential use of antioxidant enzymes and immune responses as biochemical markers to assess early detrimental effects of chemical contaminants in many different aquatic species have been published (Winston & Di Giulio, 1991; Anderson & Zeeman, 1995; Marcano *et al.*, 1997; Regoli *et al.*, 1998; Canesi *et al.*, 1999; Livingstone *et al.*, 2000; Regoli *et al.*, 2000; Nusetti *et al.*, 2001; Geracitano *et al.*, 2002; Manduzio *et al.*, 2004). However, few investigations have been directed toward assessment of the effects of complex xenobiotic mixtures (such as petroleum derived products) on benthic biota, mainly in Caribbean species. These studies should be important in countries with intensive petroleum industrial development, such as Venezuela and other countries, due to eventually oil-spill may occur causing perturbation in the aquatic ecosystem.

The aim of the present study was to evaluate antioxidant enzyme activities and immunological responses in the fish *Thalassophryne maculosa* (Pisces: Batrachoididae) after exposure to a water-accommodated fraction of No. 6 fuel oil, which is widely utilized as fuel in electricity-generated plants. The industrial products represent a source of environmental contamination, since their chemical composition includes asphaltene, aromatic resins, aromatic polycyclic hydrocarbons and heavy metals (AMOP, 2000). *T. maculosa* is a benthic fish with wide distribution in the Caribbean regions that live associated with sediments give a reference and therefore this organism is an appropriate biological indicator for assessment of environmental risk.

MATERIAL AND METHODS

Fish and bioassays

Adult specimens of *T. maculosa*, immature sexually were collected from La Restinga Lagoon, Margarita Island, in eastern Venezuela. The fishes were maintained indoors in aerated aquaria at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, containing seawater (36‰, pH 7.8) from the collection site for 15 days prior to the experimental bioassays. Two groups of 10 organisms (two replicates) were exposed to 25 or 100% of OWAF during 7 days. The oil mixture (1 g/L) was prepared by adding 1 g of fuel oil to 1 L volumes of Millipore (0.45 μm) filtered seawater, mixing with constant stirring for 5 min in a closed glass vessel. After standing for 20 min, the aqueous layer was drawn off (100%), and further diluted to 25 percent in filtered seawater. The exposure system was renewed every 3 days to minimize accumulation of waste products during the exposure period.

Enzymatic assays

After the exposure period, the fishes were immediately sampled; the gills and hepatic tissue were rapidly frozen in liquid nitrogen, and then stored at -70°C for one week prior to the enzymatic assays. Groups of eight organisms each one; control and experimental, were used for the enzymatic assays. The tissues were homogenized in (1:4) 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 M sucrose, 0.15 M KCl, and 0.2 mM PMSF. The homogenates were centrifuged at 5,000 and 12,000 $\times g$ at 4°C for 20 min to obtain the supernatant samples for the enzyme assays.

Antioxidant enzyme activities were measured by spectrophotometry at 25°C following the protocol described in Nusetti *et al.* (2001). The incubation mixtures provided optimal conditions for measuring reaction rates proportional to the quantity of enzyme extracts. GPX activity was recorded at 340 nm with 0.19 mM NADPH (extinction coefficient: $6.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 3.4 mM reduced glutathione, 0.017 U $\cdot\text{ml}^{-1}$ glutathione reductase, 17 mM H_2O_2 , and 40 mM sodium azide in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. GR activity was measured at 340 nm with 0.14 mM NADPH and 3.4 mM oxidized glutathione (GSSG) in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. GST activity was assayed at 340 nm with 0.5 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (extinction coefficient: $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) and 2 mM GSH in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5. CAT activity was determined at 240 nm with 0.6 M H_2O_2 (extinction coefficient: $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. The total enzyme activity was expressed in terms of units ($\mu\text{moles of substrate converted to product min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of wet tissue).

Lysozyme activity

The lysozyme activity was determined by the method of Osseman & Lawlor (1986). Aliquots of 40 μl of the extract from anterior kidney were dispensed into 5-mm diameter wells

in 1% agarose in 5-cm diameter Petri dishes, containing 67 mM phosphate buffer (pH 6.2) and *Micrococcus lysodeikticus* (0.6 mg freeze-dried cell.ml⁻¹) as substrate. After incubation for 48 h at 24°C, the diameters of the bacterial lyses zones were measured and the lysozyme concentration was determined by reference to a calibration curve with hen egg-white lysozyme (5 mg.ml⁻¹ in 100 mM phosphate buffer pH 6.2; HEL, Sigma Chemical Co.). The results were presented as HEL-equivalent (µg.ml⁻¹) activity, calculated by the following regression model: HEL-equivalent (µg.ml⁻¹) = antilog₁₀ {a + b·(diameter, mm)}.

Macrophage collection

The fishes were intraperitoneal injected with 2 ml of sterile seawater. The abdominal region was massaged for 5 min and then, macrophages were extracted using a heparin impregnated-5 ml syringe (20 gauge). Then the samples were centrifuged in eppendorf tubes at 200xg for 5 min at room temperature. The pellets were resuspended in 100 µl of sterilized seawater containing 5 mM EDTA, pH 7.8, followed by centrifugation, this process was repeated several times for cellular washing. The viability and the total number of cells were measured based on the trypan blue (0.4% in sterile seawater) coloration, prior to phagocytosis test.

Phagocytosis

Heat inactivated commercial yeasts was used as antigen for the phagocytes. The phagocytic activity was measured in an incubation of suspension of 100 µl peritoneal cells (1 × 10⁶ cells. ml⁻¹) and 100 µl of yeasts (5 × 10⁶ cells.ml⁻¹) for 24 hours at 4°C. Afterwards, the preparations were centrifuged at 900xg for 5 minutes. To quantify the phagocytic activity, an aliquot of 100 µl of the cell suspension was mixed with 100 µl of 0.4% crystal violet solution and 100 cells were count in a hemocytometer chamber to a magnification of the 400X

in a microscope. The cells that showed at least a yeast cell clearly visible in the cytoplasm were scored as phagocytics.

Statistical analyses

Statistic differences between experimental and control groups were examined using a one-way ANOVA. Significant differences among pairs of groups were tested by the Least Significant Differences (Zar, 1984) with significance level of 5% (α = 0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Following 7 days of exposure to 25 and 100% N. 6 fuel oil-OWAF, a significant increase (p < 0.001) in gill GST and hepatic GR activities was observed, whereas GPX and CAT were not altered with the experimental treatments (Tables 1, 2). The fuel oil-induced increase in GR and GST activities may be related with the induction of an adaptive response of GSH dependent reactions, mediating the phase II of xenobiotic metabolism and antioxidant defense pathway.

The role of GR is to maintain the cytosolic level of GSH involved in a variety of detoxification reactions, to assure the maintenance of a balance between production and removal of endogenous ROS and other pro-oxidants. This pro-oxidant/antioxidant balance and detoxification of potentially damaging ROS is crucial for cellular homeostasis (Di Giulio *et al.*, 1995; Livingstone, 2001; Correia *et al.*, 2003). GSH acts directly as a free radical quencher and as an antioxidant enzyme cosubstrate. GST catalyze conjugation reaction of GSH with xenobiotic metabolites derived of phase I reactions (NADPH cytochrome P450 reductase), transforming them into water soluble and easily excretable products. GST also functions as an antioxidant enzyme by conjugating breakdown products of lipid peroxides to GSH (Di Giulio *et al.*, 1995; Stephensen *et al.*, 2002).

Table 1 — Antioxidant enzyme activities (U/g wt mass) in liver of *Thalassophryne maculosa*, after 7-days exposure to 25 and 100% of OWSF. Values are presented as means ± S.D (n = 8).

Enzymes	Controls	25%	100%
GST	7.78 ± 3.23	12.26 ± 5.37 ^{NS}	10.43 ± 3.94 ^{NS}
GPX	21.47 ± 5.49	17.45 ± 2.91 ^{NS}	18.84 ± 4.02 ^{NS}
GR	0.86 ± 0.20	0.90 ± 0.27 ^{NS}	1.29 ± 0.27*
CAT	17.85 ± 4.04	26.50 ± 26.50 ^{NS}	23.91 ± 14.79 ^{NS}

* p < 0.05; NS: p > 0.05 respect control group.

Table 2 — Antioxidant enzyme activities (U/g wt mass) in gills of *Thalassophryne maculosa*, after 7-days exposure to 25 and 100% of OWSF. Values are presented as means \pm S.D (n = 8).

Enzymes	Controls	25%	100%
GST	4.91 \pm 0.67	16.94 \pm 3.07 ^{***}	5.72 \pm 2.13 ^{NS}
GPX	32.95 \pm 2.07	28.55 \pm 3.53 ^{NS}	31.64 \pm 2.29 ^{NS}
GR	1.38 \pm 0.33	1.42 \pm 0.20 ^{NS}	1.26 \pm 0.29 ^{NS}
CAT	0.39 \pm 0.29	0.35 \pm 0.12 ^{NS}	0.34 \pm 0.10 ^{NS}

***p < 0.001; NS: p > 0.05 respect control group.

Table 3 — Immunological parameter in the fish *Thalassophryne maculosa*, after 7-days exposure to 25 and 100% of OWSF. Values are presented as means \pm S.D (n = 8).

Parameters	Controls	25%	100%
Viability (%)	92.4 \pm 2.9	91.8 \pm 2.38 ^{NS}	92.6 \pm 4.09 ^{NS}
Cellular count (cell/ml)	2.2 \times 10 ⁶ \pm 1.0 \times 10 ⁶	1.3 \times 10 ⁶ \pm 1.6 \times 10 ⁵ ^{NS}	1.1 \times 10 ⁶ \pm 2.8 \times 10 ⁵ ^{NS}
Phagocytosis (%)	14.0 \pm 3.4	10.6 \pm 2.4 ^{NS}	12.4 \pm 2.30 ^{NS}
Lysozyme (μ g/ml)	12.8 \pm 4.4	8.25 \pm 2.82 ^{NS}	8.77 \pm 2.15 ^{NS}

*** p < 0.001; NS: p > 0.05 respect control group.

Several studies on the antioxidant enzyme responses to xenobiotics that enhance oxyradical flux, suggested that ROS increases can induce antioxidant enzymes, reflecting an adaptational and protective responses against oxidative stress. Nevertheless, individual and inter specific differences in the induction response have been reported in fishes (Winston & Di Giulio, 1991; Stephensen *et al.*, 2002). Our finding agrees with the induced GR and GST activities in rainbow trout treated with different organic toxicants (Petrivalsky *et al.*, 1997; Machala *et al.*, 1997; Stephensen *et al.*, 2002). Channel catfish exposed to contaminant effluents, showed hepatic CAT activities with dose-and time-dependent increases, but no other index of oxidative stress (malonaldehyde or methemoglobin) displayed consistent responses (Winston & Di Giulio, 1991). Moreover, Steadman *et al.* (1991) reported a dose and time dependence of xenobiotic metabolism in rainbow trout exposed to No. 2 fuel oil. Following 3 days of exposure of adult rainbow trout to sublethal level of the fuel oil observed a 25 to 50 percent depletion of glutathione. By 7-day exposure, cellular glutathione concentrations exceeded those of control by 50 to 100 percent which persisted throughout the exposure period (14 days). Increased hepatic of GSH have also been reported in cadmium-and fuel oil-exposed striped mullet (*Mugil cephalus*) (Thomas *et al.*, 1982; Thomas & Wofford, 1984).

In contrast to the antioxidant enzyme results, the immunological responses were not significantly (p > 0.05) affected by the acute OWAF exposure (Table 3), suggesting that the phagocytic function of macrophages and antibacterial activity of lysozyme of anterior kidney were not adversely altered. Probably the immune system in *T. maculosa* is less susceptible to toxicant compounds that GSH dependent antioxidant enzymes.

In conclusion, our results indicate that among the antioxidant enzymes tested, GR and GST activities were the most sensible to the acute treatment with N. 6 fuel oil, indicating that may be useful for detecting changes in the redox cellular status that may result in oxidative stress in *T. maculosa*. These finding should be considered as a contribution for further research on toxicological risk of petroleum contamination to marine benthic fishes.

REFERENCES

- ARTIC AND MARINE OILSPILL PROGRAM (AMOP), 2000, *Technical Seminar*. The 23rd AMOP Technical Seminar. Vancouver BC, Canada.
- ANDERSON, D. P. & ZEEMAN, M. G., 1995, Immunotoxicology in fish, pp. 371-402. In: G. M. Rand (ed.), *Fundamentals of aquatic toxicology*, 2nd edition. Taylor & Francis publisher, Washington, D.C.
- BESTEN, P. J., 1998, Concepts of the implementation of biomarkers in environmental monitoring. *Mar. Environ. Res.*, 46: 253-256.

- CAJARAVILLE, M. P., BEBIANO, M. J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C. & VIARENGO, A., 2000, The use of biomarker to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: a practical approach. *Sci. Total. Environ.*, 247: 259-311.
- CANESI, L., VIARENGO, A., LEONZIO, C., FILIPPELLI, M. & GALLO, G., 1999, Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissue. *Aquat. Toxicol.*, 46: 67-79.
- CAVALETTO, M., GHEZZI, A., BURLANDO, B., EVANGELISTI, V., CERATTO, N. & VIARENGO, A., 2002, Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131C: 447-445.
- CORREIA, A. D., COSTA, M. H., LUIS, O. J. & LIVINGSTONE, D. R., 2003, Age-related changes in the antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 289: 83-101.
- Di GIULIO, R. T., BENSON, W. H., SANDER, B. M. & VANVELD, P. A., 1995, Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity, pp. 523-561. In: G. M. Rand (ed.), *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. 2nd ed. Taylor & Francis LTD, London.
- GERACITANO, L., MONSERRAT, J. M. & BIANCHINI, A., 2002, Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 277: 145-156.
- LIVINGSTONE, D. R., CHIPMAN, J. K., LOWE, D. M., MINIER, C., MICHELMORE, M. N., PETERS, L. D. & PIPE, R. K., 2000, Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis*) and others mytilids. *Int. J. Environ. Pollut.*, 13: 56-91.
- LIVINGSTONE, D. R., 2001, Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 656-666.
- MACHALA, M., PETRIVALSKY, M., NEZVEDA, K., ULRICH, R., DUSEK, L., PIACKA, V. & SVOBODOVÁ, Z., 1997, Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-o-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants. A field study. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(7): 1410-1416.
- MANDUZIO, H., MONSINJON, T., GALAP, C., LÉBOULENGER, F. & ROCHER, B., 2004, Seasonal variations in antioxidant defenses in blue mussel *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione-S-transferase. *Aquat. Toxicol.*, 70(1): 83-93.
- MARCANO, L., NUSETTI, O., RODRÍGUEZ-GRAU, J., BRICEÑO, J. & VILAS, J., 1997, Coelomic fluid lysozyme activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59: 22-28.
- NUSETTI, O., ESCLAPÉS, M., SALAZAR, G., NUSETTI, S. & PULIDO, S., 2001, Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 576-581.
- OSSERMAN, E. F. & LAWLOR, D. P., 1986, Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 124: 921-951.
- PETRIVALSKY, M., MACHALA, M., NEZVEDA, K., PIACKA, V., SVOBODOVÁ, P. & DRABEK, P., 1997, Glutathione-dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver. Search for specific biochemical marker of chemical stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(7): 1417-1421.
- REGOLI, F., NIGRO, M. & ORLANDO, E., 1998, Lysosomal antioxidant responses to metals in the anthartic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic. Toxicol.*, 40: 375-392.
- REGOLI, F., 2000, Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.*, 50: 351-361.
- SHAW, J. P., LARGE, A. T., DONKIN, P., EVANS, S. V., STAFF, F. J., LIVINGSTONE, D. R., CHIPMAN, J. K. & PETERS, L. D., 2004, Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.*, 67: 325-336.
- SOLÉ, M., PORTE, C. & ALBAIGES, J., 1995a, The use of biomarker for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Sci. Total. Environ.*, 159: 147-153.
- STEADMAN, B. L., STUBBLEFIELD, W. A., LAPOINT, T. W. & BERGMAN, H. L., 1991, Decreased survival of rainbow trout exposed to No. 2 fuel oil caused by sublethal pre-exposure. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10(3): 355-363.
- STEPHENSON, E., STURVE, J. & FORLIN, L., 2002, Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C: 435-442.
- THOMAS, P., WOFFORD, H. W. & NEFF, J. M., 1982, Effects of cadmium on glutathione content of mullet (*Mugil cephalus*) tissue, pp. 109-125. In: W. V. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg & F. P. Vernberg (eds.), *Physiological mechanism of marine pollutant toxicity*. Academic Press, New York.
- THOMAS, P. & WOFFORD, H. W., 1984, Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 76: 172-182.
- VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M. & LIVINGSTONE, D. R., 1991, Seasonal variations in the antioxidant defense system and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 187-190.
- WINSTON, G. W. & DI GIULIO, R. T., 1991, Pro-oxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. *Aquatic. Toxicol.*, 19: 137-161.
- ZAR, J., 1984, *Biostatistical analysis*. 2nd ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 120p.

Sensibilidade a Cobre e Cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*

M. B. MASUTTI,^{1*} E. L. G. ESPÍNDOLA,² A. DE M. NOGUEIRA³ & F. C. F. SIMÕES⁴

^{1,2,3}NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP, Av. Trabalhador Sancarlense, 400, Centro, CEP 13566-590, São Carlos, SP

⁴IQSC/USP

RESUMO

Poucos trabalhos sobre a sensibilidade de organismos aquáticos a contaminantes ambientais são realizados utilizando-se espécies comuns aos ecossistemas brasileiros. *Oreochromis niloticus* é uma espécie amplamente distribuída em reservatórios, assim como *Pistia stratiotes*, tratando-se das espécies de peixe e macrófita, respectivamente, mais abundantes na represa do Lobo. O objetivo deste trabalho foi determinar as faixas de sensibilidade a Cu e Cr para essas duas espécies. As soluções-teste foram preparadas com água de cultivo para os peixes e com água da represa para as macrófitas, a partir de soluções-estoque de $K_2Cr_2O_7$ e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. A CL_{50} foi calculada através do método Trimmed Spearman-Kärber após 96 h de exposição para os peixes e a CE_{50} , após 168 h para as macrófitas. Foram avaliadas as seguintes características nos indivíduos de *P. stratiotes*: altura, diâmetro, número de folhas e número de raízes. Os valores de CL_{50} para Cr obtidos com os indivíduos de *O. niloticus* variaram entre 107,2 e 164 mg/L, e os valores para Cu variaram de 0,32 a 0,65 mg/L. Os valores de CE_{50} de Cr determinados nos testes com *P. stratiotes* variaram entre 22,4 e 33,7 mg/L, avaliando-se tanto o número de folhas como o número de raízes. Nos testes com cobre esses valores variaram entre 0,2 e 0,3 mg/L, considerando-se o número de raízes. Ambas as espécies testadas apresentaram maior sensibilidade ao Cu que ao Cr, e os valores de CL_{50} obtidos para os peixes e de CE_{50} obtidos para as macrófitas foram superiores aos determinados em outros trabalhos para espécies de diferentes níveis tróficos, sugerindo que essas espécies não são indicadas para uso como organismos-teste, ao menos considerando-se os parâmetros de efeito avaliados.

Palavras-chave: cromo, cobre, *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*.

ABSTRACT

Oreochromis niloticus and *Pistia Stratiotes* sensibility to copper and chromium

A few works about aquatic organisms sensibility to environmental contaminants are conducted using species common to Brazilian ecosystems. *Oreochromis niloticus* is a widespread species in reservoirs, as *Pistia stratiotes*, being the fish and macrophyte species, respectively, most abundant in Lobo reservoir. The aim of this work was to determine the sensibility range to Cr and Cu to this species. The LC_{50} was calculated by the Trimmed Spearman-Kärber method, after 96 h of exposition to fish, and the EC_{50} after 168 h to macrophytes. The follow characteristics were measured in *P. stratiotes* individuals: height, diameter, number of leaves and number of roots. The LC_{50} values range to Cr obtained with the individuals of *O. niloticus* was 107.2-164 mg/L, and the values to Cu ranged between 0.32 and 0.65 mg/L. The EC_{50} values to Cr determined in the *P. stratiotes* tests ranged from 22.4 to 33.7 mg/L, as to the leaves number estimation as to the roots number estimation. In the tests with Cu, these values ranged between 0.2-0.3 mg/L, considering the roots number. Both the species tested were more sensible to Cu than to Cr, and the LC_{50} values obtained to the fish and the EC_{50} values obtained to the macrophytes were higher than the values determined by other works to different trophic level organisms, suggesting that the species studied in this work are not indicate to use as test organism, at least considering the effect parameters evaluated.

Key words: chromium, copper, *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*.

*Corresponding author: Mariana Beraldo Masutti, e-mail: mariana.masutti@itelefonica.com.br.

INTRODUÇÃO

Os testes de toxicidade apresentam-se como mecanismos para a compreensão dos efeitos de impactos sobre os compartimentos bióticos, utilizando-se organismos vivos que atuam como biossensores, e podem prever antecipadamente impactos de determinado poluente sobre a biota. Esses testes podem avaliar a toxicidade relativa de diversos agentes químicos para uma ou diversas espécies e a sensibilidade dessas espécies ao agente tóxico. São importantes ainda na determinação de concentrações seguras de agentes químicos para a preservação da vida aquática e para a qualidade das águas e sedimentos. O objetivo geral de um teste de toxicidade é a caracterização da resposta ecológica a determinada substância ou elemento químico.

Em muitos casos, testes de toxicidade são conduzidos com organismos que podem ser facilmente obtidos, cultivados e testados, sendo a relevância ecológica dessas espécies uma consideração secundária (Chapman, 2002). Os organismos mais utilizados na avaliação da toxicidade de substâncias são as algas e o zooplâncton, porém uma grande variedade de outros organismos aquáticos são comumente usados em testes de toxicidade, incluindo invertebrados (espécies de *Daphnia*, *Gammarus*, *Brachionus*, *Ceriodaphnia*), peixes (*Poecilia* sp., *Leponis macrochirus*, *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*) e algas (*Selenastrum*, *Chlorella*, *Microcystis*, *Navicula*).

A utilização de peixes em testes de toxicidade é bem documentada e normatizada por diversas agências reguladoras (USEPA, 2002; ABNT, 1993; entre outras). Peixes são considerados bons indicadores de toxicidade devido à sua importância ecológica e comercial. No Brasil, estudos sobre a toxicidade do Cu foram realizados com *Prochilodus scrofa* (Mazon et al., 2000; Carvalho, 2003) e *Danio rerio* (Oliveira-Filho et al., 2004).

Apesar de não se tratar de uma espécie nativa, *Oreochromis niloticus* é amplamente distribuída nos reservatórios brasileiros e cultivada em piscicultura, sendo muito utilizada na alimentação humana. A maioria dos trabalhos realizados com *O. niloticus* está relacionada ao estresse oxidativo induzido pela exposição a substâncias tóxicas ou efluentes (Ribeiro et al., 2000; Tagliari et al., 2004), pela bioacumulação de metais (Clearwater et al., 2002; Çogun & Kargm, 2004) e por técnicas de cultivo e alimentação (Pan et al., 2003; Çogun & Kargm, op. cit.). Apesar de Cu e Cr serem utilizados em rações como suplemento alimentar para *O. niloticus* (Pan, op. cit.; Clearwater, op. cit.), diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos tóxicos desses metais em peixes.

Pistia stratiotes é uma planta aquática flutuante, sem caule, que pode atingir até 25 cm de diâmetro, nativa da América Tropical e amplamente distribuída por todo o Brasil. Os trabalhos realizados com *P. stratiotes* referem-se à sua distribuição, composição química (Klump et al., 2002) e utilização em "wetlands" construídas para tratamento de efluentes (Cervantes

et al., 2001). A utilização dessas plantas como biorremediadores no tratamento de águas residuárias e como indicadores de contaminação ambiental é mais comum que seu uso em testes de toxicidade. Nos testes de toxicidade com *P. stratiotes*, é mais comum a verificação da ocorrência de bioacumulação como parâmetro de efeito (Maine et al., 2004; Klump, op. cit.).

Sobre a toxicidade de metais para *P. stratiotes* há poucos dados disponíveis. *Pistia* apresenta características morfológicas mais adequadas que *Lemna*, espécie normatizada para utilização em testes de toxicidade (USEPA, 1996), nos estudos em fisiologia e bioquímica (Tarlyn et al., 1998), além de se reproduzir por brotos, possibilitando a utilização de plantas geneticamente idênticas. Testes de toxicidade com macrófitas normalmente são realizados com *Lemna* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

Oreochromis niloticus

Indivíduos juvenis com comprimento médio de 4,1 cm e peso médio de 0,6 g foram coletados de tanques de cultivo mantidos pelo CRHEA-USP. Após a coleta, os peixes foram mantidos em laboratório em meio ASTM, com dureza entre 40 e 48 mg Ca-Mg/L e pH entre 7,2 e 7,6, até realização dos testes. Os peixes não foram alimentados nas 24 h anteriores à realização dos testes.

Os testes foram realizados baseando-se na metodologia descrita pela norma NBR 12714:1993 (ABNT, 1993), em duplicata, utilizando 2 litros de solução por réplica, mantendo-se uma proporção de 1 g de peixe por litro de solução. A CL₅₀ 96 h foi calculada através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977).

Com base nos testes de sensibilidade para *Danio rerio* realizados rotineiramente no laboratório de Ecotoxicologia do NEEA/CRHEA/USP, que utiliza K₂Cr₂O₇, foi determinada a primeira faixa de concentração testada para Cr com *O. niloticus*. As concentrações-teste (60, 90, 120, 150 e 180 mg/L Cr) foram preparadas com água de cultivo, a partir de soluções-estoque de K₂Cr₂O₇, com concentração de Cr 1 g/L em água destilada.

Com base em dados de CL₅₀ reportados pela literatura para outros peixes (Mazon et al., 2000; Carvalho, 2003; Oliveira-Filho et al., 2004), foi escolhida a faixa de concentrações a ser testada (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1,0 mg/L de Cu). As soluções foram preparadas em meio de cultivo a partir de uma solução-estoque de CuSO₄.5H₂O, contendo 1 g Cu/L, preparada em água destilada.

Pistia stratiotes

Os indivíduos de *P. stratiotes* utilizados nos testes foram coletados manualmente na represa do Lobo. Após a coleta, as macrófitas foram mantidas em aquário, no laboratório de Ecotoxicologia, com água proveniente do mesmo local onde foram coletadas as plantas. Foram mantidos indivíduos adultos, que apresentavam brotos, os quais foram retirados no dia da

montagem dos testes. Todas as plantas tiveram as folhas e raízes lavadas para a retirada de lagartas e pulgões. Antes da montagem dos testes, todos os indivíduos tiveram as raízes cortadas e a biometria determinada. A metodologia utilizada foi adaptada a partir das metodologias utilizadas em testes com *Lemna* sp. (USEPA, 1996): o teste seguiu o mesmo desenho dos testes com *Lemna* sp., porém, como o ciclo de vida de *P. stratiotes* é mais longo, outros parâmetros de efeito, diferentes de número de frondes e letalidade, foram investigados, como o comprimento e número das raízes.

Os indivíduos utilizados nos testes apresentavam 5-6 cm de altura e entre 3 e 5 folhas. Os testes foram montados em recipientes plásticos com 2 litros de capacidade, e em cada recipiente foram adicionados 5 indivíduos em 1 litro de solução. Os testes foram realizados em triplicata, com 3 concentrações mais um controle para cada metal.

Foram avaliadas as seguintes características após 168 h de exposição: altura, diâmetro, número de folhas e número de raízes. A $CE(I)_{50}$ 168 h foi calculada através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Foram considerados como parâmetros de efeito o número de folhas final em comparação com o número de folhas inicial e o número de raízes desenvolvidas durante o tempo de exposição, reportando os efeitos como inibição em relação ao controle.

As concentrações de Cr utilizadas nos testes com *P. stratiotes* foram baseadas em dados apresentados pela literatura (Kahkonen & Manninen, 1998; Vajpayee *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2000) em testes com outras macrófitas, como *Lemna* sp., *Nelumbo nucifera* e *Elodea canadensis*. As soluções foram preparadas a partir de água coletada na represa do Lobo, no mesmo local onde foram coletadas as macrófitas. As concentrações-teste utilizadas em dois testes preliminares foram 1, 5 e 10 mg/L de Cr, sendo que nenhum efeito foi observado, comparando-se com o controle. Em seguida foram realizados 2 testes com concentrações iguais a 10, 50 e 100 mg/L Cr e um teste com concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 mg/L Cr.

As soluções de Cu foram preparadas a partir da água coletada na represa do Lobo, mesmo local onde foram coletadas as macrófitas. As concentrações-teste utilizadas nos dois primeiros testes foram 1, 5 e 10 mg/L, tendo ocorrido senescência completa nas plantas expostas à concentração mais alta. Foram realizados, então, 3 testes com concentrações mais baixas, entre 0,1 e 1,0 mg/L, sendo em dois deles utilizadas 3 concentrações (0,1; 0,5; e 1,0 mg/L) e no último 5 concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1,0 mg/L Cu).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oreochromis niloticus

Os valores de CL_{50} obtidos para Cr com os indivíduos de *O. niloticus* variaram entre 107,2 e 164 mg/L. Apesar do pequeno número de réplicas entre os testes, os valores de CL_{50} determinados apresentaram valores de desvio-padrão e

coeficiente de variação iguais a 27 mg/L e 20%, respectivamente. Esses valores são relativamente altos, considerando-se um desvio-padrão aceitável de 20%.

A CL_{50} média determinada neste trabalho para *O. niloticus* é um pouco superior às reportadas pela literatura para outros peixes, como *Pimephales* sp., sugerindo a tolerância dessa espécie ao metal em questão. Os valores de CL_{50} de dicromato de potássio para peixes variam bastante em função das espécies utilizadas (Tabela 1), sendo o Cr considerado pouco tóxico para peixes, não apresentando toxicidade aguda nas concentrações ambientais (Orme & Kegley, 2004). Apesar da aparente baixa toxicidade do Cr, valores entre 0,28 e 0,33 mg/L de dicromato de potássio são reportados como CL_{50} para *O. niloticus*, considerando a inibição no crescimento como efeito.

Os valores de CL_{50} de Cu obtidos com os indivíduos de *O. niloticus* variaram de 0,32 a 0,84 mg/L de Cu (Tabela 1). *O. niloticus* apresentou sensibilidade muito maior ao Cu que ao Cr, e comparando-se os valores determinados para *O. niloticus* com os reportados para outros peixes, como *Prochilodus scrofa*, *Cichlasoma facetum* e *Pimephales* sp. (Tabela 2), essa espécie é bastante sensível ao Cu, porém, *O. niloticus* mostrou-se muito menos sensível ao Cu que *Danio rerio*, espécie normatizada para testes de toxicidade pela ABNT (ABNT, 2003).

Pistia stratiotes

Dentre os parâmetros avaliados, o desenvolvimento de folhas e raízes foram os melhores indicadores de efeito para os contaminantes estudados. Assim, a CE_{50} 168 h foi calculada em função desses parâmetros, utilizando valores referentes ao aumento no número de folhas, ao número de raízes desenvolvidas e ao comprimento médio dessas raízes no período de exposição aos contaminantes.

Os valores médios de CE_{50} de Cr variaram entre 30,5 e 36,5 mg/L (Tabela 3). Esses valores são um pouco maiores que os valores tóxicos para *P. stratiotes* reportados por Orme & Kegley (2004), variando de 1 a 20 mg/L, com base em efeitos bioquímicos, histológicos e mortalidade.

O desenvolvimento de raízes foi estimulado pela adição de Cu na concentração mais baixa de cada teste. Os valores de CE_{50} variaram de 0,18 a 0,47 mg/L de Cu para o número de raízes e de 0,46 a 0,52 mg/L de Cu para o comprimento médio das raízes (Tabela 4). Para o número de folhas, a CE_{50} só pode ser calculada em um dos testes. *P. stratiotes* aparenta ser mais sensível que *Lemna* sp. ao Cu. Valores reportados pela literatura de CE_{50} para *Lemna minor*, em testes de 5 dias, são da ordem de 2 mg/L (Orme & Kegley, 2004).

Entre os parâmetros utilizados nos cálculos de CE_{50} , o comprimento das raízes foi o que gerou os menores valores para desvio-padrão e coeficiente de variação. Os valores de CE_{50} calculados para cada um dos parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA, $p < 0,05$), tanto para os testes com Cr quanto para os testes com Cu.

Tabela 1 — Valores médios de CL₅₀ de Cr e Cu para *O. niloticus* (n = 5 réplicas).

	Cr (mg/L)	Cu (mg/L)
CL ₅₀ 96 h (média)	133,5	0,59
Faixa de sensibilidade	(79,5-187,5)	(0,21-0,96)
Desvio-padrão	27,0	0,19
Coefficiente de variação	20,2	32

Tabela 2 — Valores de CL₅₀ 96 h de Cu e Cr para diferentes espécies de peixes.

Espécies	CL ₅₀ mg/L Cr	CL ₅₀ mg/L Cu	Referência
<i>Danio rerio</i>		0,083-0,152	Oliveira-Filho <i>et al.</i> , 2004
<i>Prochilodus scrofa</i>		0,014-0,098	Carvalho, 2003
<i>Cichlasoma facetum</i>	20,7	1,4	Rossini & Ronco, 2001
<i>Pimephales</i> sp.	10-109		Rossini & Ronco, 2001
<i>Pimephales</i> sp.		0,1-84	Rossini & Ronco, 2001
<i>Oreochromis niloticus</i>	133,5	0,59	Este trabalho

Tabela 3 — Valores de CE₅₀ 168 h (mg/L Cr) para *P. stratiotes* (n = 5 réplicas).

	Número de raízes	Número de folhas	Comprimento das raízes
CE ₅₀ média	36,5	31,8	30,5
Faixa de sensibilidade	(0-80,3)	(14,5-49,1)	(24-37,0)
Desvio-padrão	21,9	8,7	3,3
Coefficiente de variação	60,1	27,2	10,7

Tabela 4 — Valores de CE₅₀ 168 h (mg/L Cu) para *P. stratiotes* (n = 5 réplicas).

	Número de raízes	Número de folhas	Comprimento das raízes
CE ₅₀ média	0,37	0,42	0,50
Faixa de sensibilidade	0,043-0,69	*	0,43-0,56
Desvio-padrão	0,16	*	0,03
Coefficiente de variação	44,17	*	6,47

*Valores não calculados.

De forma geral, o número de raízes desenvolvidas e o comprimento dessas raízes apresentaram sensibilidade similar nos testes realizados, enquanto o número de folhas parece não ser um bom parâmetro de efeito.

As maiores dificuldades encontradas na realização dos testes de toxicidade com *P. stratiotes* foram a obtenção de número de indivíduos suficiente para a realização de cada teste que apresentassem características semelhantes, como número de folhas e relação altura/diâmetro, e a isenção desses indivíduos de lagartas e pulgões antes da utilização nos testes. Uma alternativa para eliminar esses efeitos seria o cultivo das plantas em laboratório. Culturas axênicas de *Pistia* apresentam indivíduos de menor tamanho, morfologia complexa representativa, alta taxa de crescimento, facilidade de manipulação e hábito de crescimento por clones, sendo em geral mais uniformes que plantas não axênicas, não apresentando alterações morfológicas e fisiológicas mesmo após muitas subculturas (repicagens) (Tarlyn *et al.*, 1998).

CONCLUSÕES

Ambas as espécies estudadas foram mais sensíveis ao Cu que ao Cr e apresentaram sensibilidade similar para Cu, considerando-se os valores de CL_{50} e CE_{50} obtidos. Cromo foi mais tóxico para *P. stratiotes* que para *O. niloticus*, apresentando efeitos sobre essa espécie de macrófita em concentrações muito menores que as determinadas como letais para os peixes.

Os resultados apontam que *O. niloticus* é uma espécie adequada para a utilização em testes de toxicidade, apresentando sensibilidade similar a outros peixes utilizados em testes de toxicidade para Cr e Cu, como *Pimephales* sp., além de apresentar a vantagem de se tratar de uma espécie amplamente distribuída em reservatórios. Os testes realizados com *P. stratiotes* foram bastante reprodutíveis, com pequena variabilidade entre os valores de CE_{50} obtidos. Considerando a sensibilidade da espécie aos metais testados, maior que a reportada para *Lemna*, e a possibilidade de cultivo em laboratório, gerando indivíduos mais homogêneos, *P. stratiotes* também apresenta as características necessárias para sua utilização em testes de toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, 1993, *NBR 12715 – Água, ensaio de toxicidade aguda com peixes*. Parte I – Sistema Estático. Rio de Janeiro.
- CARVALHO, C. S., 2003, Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e no fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Tese de Doutorado, PPG ERN, UFSCar, São Carlos, 106p.
- CHAPMAN, P. M., 2002, Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 7-15.
- CERVANTES, C., CAMPOS-GARCÍA, J., DEVARS, S., GUITIÉRREZ-CORONA, F., LOZA-TAVERA, H., TORRES-GUZMÁN, J. & MORENO-SANCHÉZ, R., 2001, Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology reviews*, 25: 335-347.
- CLEARWATER, S. J., FARAG, A. M. & MEYER, J. S., 2002, Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 132: 269-313.
- ÇOĞUN, H. Y. & KARGM, F., 2004, Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 55: 277-282.
- GUITIÉRREZ, P. A., ONGAY, J. P. & VERCESI, M. L., 2000, Efectos de Cr (VI) sobre los umbrales experimentales y biológicos de tres especies de *Lemna* (Angiospermae: Lemnaceae): una aproximación comparativa. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer, L., A. Oliveira Neto. *Ecotoxicologia: perspectivas para o Século XXI*. RiMa Editora, São Carlos, pp. 309-314.
- KÄHKÖNEN, M. A. & MANNINE, P. K. G., 1998, The uptake of nickel and chromium from water by *Elodea canadensis* at different nickel and chromium exposure levels. *Chemosphere*, 36(6): 1381-1390.
- HAMILTON, M. *et al.*, 1977, Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, 11(7): 714-719.
- KLUMPP, A., BAUER, K., FRANZ-GERSTEIN, C. & MENEZES, M., 2002, Variation of nutrient and metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil). *Environmental International*, 28: 165-171.
- MAINE, M. A., SUÑE, N. L. & LAGGER, S., 2004, Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Research*, in press.
- MAZON, A. F., PINHEIRO, G. D. H. & FERNANDES, M. N., 2000, Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial à biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em Curimatá, *P. scrofa* (Tleostei, Prochilodontidae). In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer, L., A. Oliveira Neto. *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*, RiMa Editora, São Carlos, pp. 327-342.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C., LOPES, R. M. & PAUMGARTTEN, F. J. R., 2004, Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 56: 369-374.
- ORME, S. & KEGLEY, S., 2004, *PAN Pesticide Database*. Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA. 2004). Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org>.
- PAN, Q., LIU, S., TAN, Y. G. & BI, Y. Z., 2003, The effect of chromium piclinate on growth and carbohydrate utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 225: 421-429.
- RIBEIRO, L., TRIBESS, T., TORRES, M. A., SOARES, C. H. L., PEDROSA, R. C., AGOSTINI, J., BUENO, A. & WILHEM FILHO, D., 2000, Estresse oxidativo em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao efluente de indústria têxtil. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer & L. A. Oliveira Neto. *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RiMa Editora, São Carlos, pp. 441-449.
- ROSSINI, G. D. B. & RONCO, A. E., 2001, Sensibilidad de *Cichlasoma facetum* (Ciclididae, Pisces) a metais pesados. In: J. Herkovits (ed.), *Toxicología y química ambiental*. Contribuciones para un Desarrollo Sustentable, 8-10. Setac LA, Buenos Aires.
- TAGLIARI, K. C., VARGAS, V. M. F., ZIMIANI, K. & CECCHINI, R., 2004, Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17: 149-157.

- TARLYN, N. M., KOSTMAN, T. A., NAKATA, P. A., KEATES, S. E. & FRANCESCHI, V. R., 1998, Axenic cultures of *Pistia stratiotes* for use in plant biochemical studies. *Aquatic Botany*, 60: 161-168.
- VAJPAYEE, P., SHARMA, S. C., TRIPATHI, R. D., RAI, U. N. & YUNUS, M., 1999, Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* GAERTN. *Chemosphere*, 39(12): 2159-2169.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996, *Ecological effects test guidelines OPPTS 850.4400 aquatic plant toxicity test using Lemna spp.*, Tiers I and II.
- U.S. EPA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002, *EPA- 821-R-02-012 Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Fifth Edition, Washington.



SETAC – Brazil

Testes de Toxicidade com *Daphnia magna*: Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB

K. DOS SANTOS LAITANO & W. G. MATIAS*

Departamento de Engenharia Sanitária-Ambiental, UFSC, LABTOX,
Campus Universitário, Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC

RESUMO

Testes de toxicidade com organismos aquáticos constituem uma ferramenta efetiva para avaliação, predição ou detecção dos efeitos dos poluentes sobre os organismos vivos. Embora existam diversos sistemas de tratamento de esgotos e de resíduos implantados, a maioria apresenta problemas de funcionamento e não cumpre com sua finalidade de tratamento e disposição correta desses resíduos. reatores UASB (reator anaeróbio de fluxo ascendente) têm sido utilizados com sucesso para tratamento de efluentes e de lixiviados provenientes de outros sistemas de tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de um reator experimental do tipo UASB no tratamento de lixiviado, por meio de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*. Foram realizadas 16 coletas de efluente ao longo de 6 meses, antes e após o tratamento no reator. O acompanhamento da toxicidade dos efluentes antes e após o tratamento no reator UASB permitiu detectar alterações provenientes da própria operação do sistema de tratamento. Os resultados indicam que o tratamento de efluentes nesse tipo de reator pode reduzir a toxicidade original das amostras em até 80%. Contudo, os baixos valores de CE_{50} encontrados nos testes demonstram a presença de alta toxicidade para todas as amostras. Quanto aos parâmetros físico-químicos monitorados, observamos a capacidade desse tipo de reator tratar lixiviados mesmo utilizando diferentes cargas orgânicas, pois a taxa de remoção de DQO foi constante ao longo de todo o período. Os testes de toxicidade usados no presente trabalho estão baseados no efluente como um todo e podem fornecer um caminho para avaliar um efluente na ausência de informações detalhadas sobre as substâncias que o mesmo contém. A vantagem de usar organismos vivos para detectar a toxicidade é que os efeitos observados são realmente aqueles provocados pelas substâncias que estão biodisponíveis, ou que estão numa forma em que afetam diretamente os organismos. Esforços devem ser direcionados para aumentar a eficiência desse reator, melhorando ainda mais a qualidade dos efluentes tratados nesse sistema.

Palavras-chave: testes de toxicidade, *Daphnia magna*, reator UASB, lixiviado.

ABSTRACT

Toxicity tests with *Daphnia magna*: a tool to evaluate a experimental UASB reactor

Toxicity bioassay with aquatic organisms are an effective tool to assess, predict or simply detect pollution effects on living organisms. Although diverse systems of sewage treatment systems exist, the majority of them presents have functioning problems and they do not fulfill with its purpose of treatment and correct disposal of these residues. UASB reactors (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) have been used to treat effluents and leachate deriving from other treatment systems. The aim of this research was evaluate the efficiency of an experimental UASB reactor in the leachate treatment, utilizing acute toxicity tests with *Daphnia magna*. Sixteen effluent samples were collected during six months, before and after the reactor's

* Corresponding author: William Gerson Matias, e-mail: will@ens.ufsc.br.

treatment. The effluent toxicity evaluation allowed the detection of changes caused by the own treatment system operation. Results showed that the effluent treatment in this kind of reactor could reduce toxicity up to 80%, although low values of EC_{50} for carried tests showed high toxicity in all samples. The toxicidade tests used in the present work are based on the whole effluent and can show a way to evaluate an effluent when there is no detailed information that the same contain. Efforts should address the increase of reactor's efficiency, improving the quality of treated effluents in this system.

Key words: toxicity testes, *Daphnia magna*, UASB reactor, leachate.

INTRODUÇÃO

Testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos-teste são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos. Estes testes constituem-se basicamente na exposição de organismos a diferentes condições, as quais tentam simular o ambiente natural, visando assim a detectar seus efeitos letais e/ou subletais.

Testes de toxicidade com invertebrados aquáticos fornecem importante suporte na determinação de impactos químicos ao meio ambiente (Gherardi-Goldstein *et al.*, 1990). O microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* tem sido amplamente utilizado como indicador biológico em estudos e controle da qualidade da água e em testes de toxicidade na avaliação de efluentes (Nieto, 2000).

Os lixiviados são muitas vezes os principais causadores da poluição gerada pelos aterros e lixões. A água de chuva precipitada sobre aterros sanitários, bem como águas de nascentes, percolam através do lixo, diluem e carregam a matéria orgânica e os contaminantes, dando origem ao líquido percolado, que pode causar sérios problemas ambientais. A alta carga orgânica e a complexa composição desses líquidos podem comprometer a qualidade de águas nas regiões próximas e de interferência aos aterros sanitários, seja através do deflúvio para corpos de água superficiais ou através da infiltração até lençóis subterrâneos. Esta complexa composição pode conferir elevado grau de toxicidade, caso não seja tratado adequadamente.

Existe grande dificuldade em tratar lixiviados, já que estes não têm composição definida. O tratamento depende de muitos fatores, entre eles: composição do resíduo, concentração de material orgânico biodegradável, densidade, tipo de pré-tratamento, seqüência de disposição, compactação, profundidade, material de cobertura, fatores climáticos, tempo de disposição, entre outros.

Embora existam diversos sistemas de tratamento de efluentes e de resíduos implantados, a maioria deles apresenta problemas de funcionamento e não é efetiva no tratamento e na disposição correta desses resíduos. Reatores UASB (reator

anaeróbio de fluxo ascendente) têm sido utilizados com sucesso no tratamento de efluentes e de lixiviados provenientes de outros sistemas de tratamento. Nesse tipo de reator, as bactérias responsáveis pela conversão da matéria orgânica são retidas no seu interior, o que possibilita menores tempos de detenção hidráulica, tornando assim estes sistemas competitivos em relação a outras possibilidades de tratamento de águas residuárias e compatíveis com a eficiência dos processos aeróbios.

Porém, sabe-se que nem sempre um bom desempenho no sistema de tratamento significa redução dos efeitos tóxicos do efluente. Mesmo com eficiente tratamento de efluentes, substâncias xenobióticas, inibidoras, genotóxicas ou não biodegradáveis podem não ser removidas e, assim, causar impactos sobre os ecossistemas.

Poucos são os trabalhos no Brasil que correlacionam o desempenho e a tratabilidade dos efluentes com sua toxicidade (Quaglia & Quadros, 1995). A grande maioria dos trabalhos aborda principalmente as características físico-químicas do efluente e seus impactos no corpo receptor. O emprego de testes de toxicidade aguda em efluentes permite avaliar os possíveis impactos que às vezes a simples caracterização físico-química da água não revela.

O presente trabalho visa a contribuir com os estudos de toxicidade aguda através de uma avaliação da eficiência de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) experimental no tratamento de lixiviados, utilizando como ferramenta os testes de toxicidade com *Daphnia magna*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O reator UASB utilizado foi construído em acrílico e seu volume útil é de 9,5 litros. O reator foi operado em temperatura ambiente, com exceção dos meses frios, quando foi realizado aquecimento interno com banho termostatizado, para manter a temperatura na faixa dos 25° a 27°C. A alimentação foi feita por meio de uma bomba peristáltica com fluxo contínuo, sendo que os parâmetros, demanda química de oxigênio (DQO), pH, carga orgânica volumétrica (COV – gDQO/L.r.d), tempo de retenção hidráulica (TRH) e vazão (Q), foram monitorados semanalmente.

O reator foi operado em regime contínuo durante 288 dias, sendo que a carga orgânica foi aumentada ao longo do tempo para verificarmos a eficiência de remoção de DQO. As amostras do lixiviado utilizadas nos experimentos foram coletadas na entrada (afluente) e na saída (efluente) do reator UASB.

Quanto aos testes de toxicidade aguda, estes foram realizados seguindo as normas técnicas propostas por CETESB (1986). Em cada teste foram utilizados diferentes fatores de diluição em duplicata, além de frascos controle (sem adição de lixiviado). Para cada concentração foi observada a imobilidade e/ou a mortalidade dos indivíduos após o período de exposição de 24 e 48 horas, encerrando o teste após 48 horas.

A partir dos dados de imobilidade e/ou mortalidade do organismo-teste, calculou-se a CE_{50} utilizando o método de Sperman-Karber “Trimmed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentration in toxicity bioassays” para a avaliação da toxicidade aguda através do programa computacional “LC50 Programs JS Pear test” (Hamilton, 1977).

Após a obtenção dos valores de CE_{50} , foi calculada a porcentagem de redução de toxicidade através da fórmula proposta por Isidori *et al.* (2003):

$$\%redução = 1 - \left(\frac{CE_{50}bruto}{CE_{50}tratado} \right) \times 100$$

Os testes de toxicidade foram realizados durante um período de 6 meses a partir da estabilização do reator. Foram realizados 32 testes de toxicidade, sendo 16 com o afluente e 16 com o efluente proveniente do reator UASB.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores dos parâmetros analisados no lixiviado tratado pelo reator UASB, bem como os valores da CE_{50} , 48 h, estão na Tabela 1.

Tabela 1 — Características das amostras e valores da CE_{50} , 48 h, em % de diluição, para as amostras de afluente e efluente, provenientes do reator UASB.

Tempo de operação (dias)	pH	Temperatura °C	% Remoção DQO	COV	TRH (dias)	Vazão	CE_{50} afluente	CE_{50} efluente
128	8,8	21,8	79,9	5,4	2,5	3,8	13,4	<10
133	7,2	18,9	55,0	4,5	2,5	3,8	13,8	<10
157	8,1	26,4	86,0	6,0	2,0	4,7	<6,3	3,1
163	7,9	26,5	22,0	6,1	1,7	5,6	<6,3	17,7
176	7,7	21,1	NA	5,5	1,3	7,1	4,4	9,5
190	7,6	26,4	96,0	6,0	1,7	5,6	4,4	17,7
197	8,0	28,4	96,0	5,4	1,3	7,1	4,8	17,7
205	7,9	24,5	92,0	6,0	1,9	4,9	2,2	8,2
212	7,9	25,2	99,0	6,0	1,9	4,9	5,5	13,2
226	7,8	24,0	96,0	5,9	3,4	2,8	0,5	18,1
247	7,4	30,0	NA	7,0	1,2	8,0	2,9	21,5
252	8,0	22,7	81,6	6,6	1,1	8,5	2,9	17,7
262	8,3	20,6	NA	7,0	1,2	8,0	2,9	19,6
269	7,4	25,3	86,7	8,6	1,0	9,7	1,1	23,7
275	7,4	30,2	85,4	8,1	1,0	9,5	1,1	21,2
287	7,7	28,6	NA	8,1	1,1	9,0	1,1	21,8
Média	7,8	25,0	81,3	6,4	1,7	6,4	4,4	16,5
Desvio-padrão	0,4	3,4	22,1	1,1	0,7	2,2	4,2	5,9
Coef. de variação	0,1	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	1,0	0,4

NA = não avaliado.

Quanto aos parâmetros físico-químicos monitorados, observamos a capacidade deste tipo de reator de tratar lixiviados mesmo utilizando diferentes cargas orgânicas, pois a taxa de remoção de DQO foi constante ao longo de todo o período.

Analisando os valores de CE_{50} obtidos para os afluentes e efluentes (Figura 1) verificamos grande variabilidade ao longo do tempo. Gherardi-Goldstein *et al.* (1985) também encontraram amplas variações na toxicidade de efluentes, independente da existência ou não de tratamento.

A toxicidade do afluente tende a aumentar (diminuição dos valores de CE_{50}), enquanto a toxicidade do efluente tratado tende a diminuir (aumento dos valores da CE_{50}). Os baixos valores de CE_{50} encontrados nos testes, principalmente com o afluente, demonstram a presença de alta toxicidade para todas as amostras.

Mesmo com grande variação temporal da toxicidade dos efluentes testados foi possível calcular a porcentagem de redução de toxicidade (Tabela 2), proporcionada pela utilização do reator UASB para o tratamento de efluentes. Para um tempo de exposição de 48 h, a porcentagem de remoção média de toxicidade foi de 81%, com um desvio-padrão de 14,6 e coeficiente de variação de 0,2.

Os valores de redução de toxicidade obtidos neste trabalho estão muito próximos dos encontrados por Zagatto *et al.* (1988), que observaram um nível de redução de toxicidade de 85% para efluentes industriais. Nieto (2000), em seus experimentos, observou que indústrias que utilizam reatores anaeróbios como tratamento primário ou secundário conseguem reduzir de 92,7% a 97,6% a toxicidade original dos efluentes.

Apesar da variabilidade ao longo do tempo, apenas nas primeiras amostragens é que a toxicidade do efluente é maior do que a toxicidade do afluente. Isto pode ser atribuído ao fato de que o reator estava no início de operação e, portanto, não estabilizado suficientemente para eliminar os compostos tóxicos presentes nas amostras.

Os testes de toxicidade usados no presente trabalho estão baseados no efluente como um todo e podem fornecer um caminho para avaliar um efluente na ausência de informações detalhadas sobre as substâncias que o mesmo contém. A vantagem de usar organismos vivos para detectar a toxicidade é que os efeitos observados são realmente aqueles provocados pelas substâncias que estão biodisponíveis, ou que estão numa forma em que afetam diretamente os organismos.

O acompanhamento da toxicidade dos efluentes antes e após o tratamento no reator UASB permitiu detectar alterações provenientes da própria operação do sistema de tratamento. Considerando todos os problemas operacionais desse reator encontrados ao longo do tempo pode-se concluir que o reator consegue remover a toxicidade original do efluente em até 80%. Além disso, a eficiência média de remoção de DQO foi de 75%, valor muito próximo aos encontrados por Calvacanti (2003). Os baixos valores de CE_{50} observados nos testes demonstram a presença de alta toxicidade mesmo após o tratamento das amostras de lixiviado no reator UASB.

Os testes de toxicidade realizados confirmam que esta é uma ferramenta prática e vantajosa na avaliação da toxicidade de efluentes, apresentando respostas rápidas e seguras para o controle e monitoramento da qualidade ambiental.

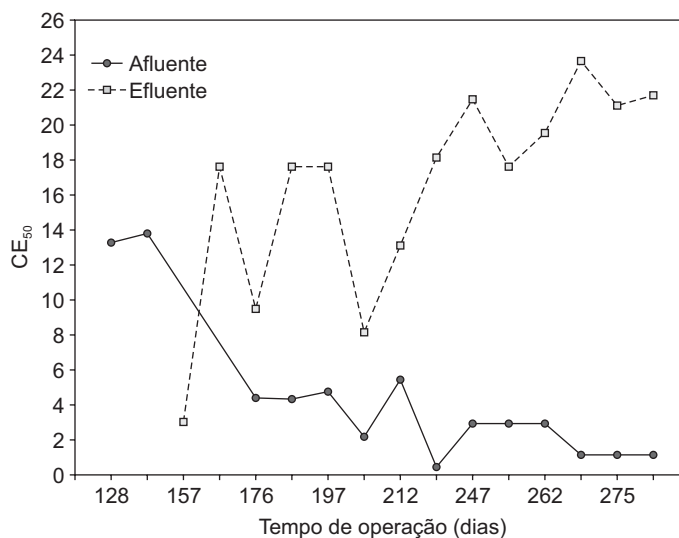


Figura 1 — Evolução da toxicidade ao longo do tempo.

Tabela 2 — Porcentagem de redução de toxicidade obtida nos testes com os afluentes e com os efluentes.

Tempo de operação (dias)	Redução da toxicidade (%)
128	NC
133	NC
157	NC
163	NC
176	53,4
190	75,0
197	73,0
205	73,1
212	58,8
226	97,5
247	86,5
252	83,5
262	85,1
269	95,4
275	94,8
287	94,9
Média	80,9
Desvio-padrão	14,6
Coefficiente de variação	0,2

NC = não calculável.

Agradecimentos — Os autores agradecem ao CNPQ/Prosab, pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAVALCANTI, P. F. F., 2003, *Integrated application of the UASB reactor and ponds for domestic sewage treatment in tropical regions*. Doctoral Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 141p.
- CETESB, 1986, *Água: Testes de toxicidade aguda com Daphnia similis*. Claus, 1976 (Cladocera, Crustácea). L5.019-1. São Paulo, 28p.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E. *et al.*, 1985, Estimativa da carga poluidora de efluentes industriais da região de Cubatão através de ensaios biológicos com microcrustáceos e peixes. *Anais 13º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. ABES, Maceió-AL, p.10.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E., BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P. A., ARAUJO, R. P. A. & RAMOS, M. L. L. C., 1990, Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. CETESB, São Paulo, Série manuais, v. 6, 17p.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURSTON, R. V., 1977, Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11: 714-719.
- ISIDORI, M., LAVORGNA, M., NARDELLI, A. & PARRELLA, A., 2003, Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach. *Chemosphere* 52: 85-94.
- NIETO, R., 2000, Caracterização ecotoxicológica de efluentes líquidos industriais – ferramenta para ações de controle da poluição das águas. *Anais 17º Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*.
- QUAGLIA, L. J. C. & QUADROS, R. A. Q., 1995, Caracterização da toxicidade aguda dos efluentes setoriais e final da Bahia Sul Celulose. *In: Anais Congresso anual de celulose de papel da ABTCP*. São Paulo, pp. 577-589.
- ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. & GHERARDI-GOLDSTEIN, E., 1998, Toxicidade de efluentes industriais da bacia do rio Piracicaba. *Revista Ambiente*, 2: 39-42.



SETAC - Brazil

Utilização de Testes de Toxicidade com Embriões da Ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) para Avaliação da Eficiência de uma Estação de Tratamento de Esgotos de Vitória (ES)

R. A. MAGRIS,* F. PASSAMANI, F. P. BINDA & L. LOUREIRO FERNANDES

Depto. de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo,
Av. Fernando Ferrari s/n, CEP 29060-900, Vitória, ES

RESUMO

A Estação de Tratamento de Esgoto da Universidade Federal do Espírito Santo (ETE-UFES) está localizada no Campus Universitário de Goiabeiras, em Vitória, ES. A tecnologia de tratamento desta ETE consiste na associação em série de reatores anaeróbios do tipo UASB (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente) e biofiltros aerados submersos, constituindo-se em um processo biológico que realiza o tratamento de esgoto em nível secundário. Este estudo propõe avaliar preliminarmente as características ecotoxicológicas do esgoto bruto e do esgoto tratado da ETE-UFES, através da utilização de bioensaios com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae*, e ainda verificar a eficiência da estação em termos de redução do efeito tóxico do sistema sobre o desenvolvimento embrionário da ostra. Animais adultos coletados em áreas não poluídas foram utilizados para obtenção dos embriões, os quais foram expostos a diferentes concentrações de amostra composta de esgoto bruto e tratado durante um período de 24 horas. Após este período foi contado o número de embriões, larvas normais e anormais. A partir dos dados obtidos foram determinadas as CE_{50} através do método Trimmed Spearman-Kärber. Foi observada a ocorrência de diversos tipos de anormalidades envolvendo a má formação da concha ou o desenvolvimento retardado dentro do tempo esperado. A CE_{50} obtida para o esgoto bruto foi de 13,02% e para o esgoto tratado, de 25,73%. Os valores encontrados indicaram que há severo efeito nocivo dos esgotos brutos e tratados sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae*. A ETE-UFES apresentou baixa eficiência na remoção da toxicidade, indicando que prováveis toxinas persistem ao tratamento, sendo responsáveis pela toxicidade remanescente. O uso de testes de toxicidade com embriões da ostra revelou ser apropriado para avaliação da eficiência de estações de tratamento de esgotos por responderem à ação nociva como um todo e por terem se apresentado altamente sensíveis.

Palavras-chave: teste de toxicidade, esgoto bruto, esgoto tratado, ETE, *Crassostrea rhizophorae*.

ABSTRACT

Utilization of tests of toxicity with embryos of oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) for evaluation the efficiency of the sewage treatment plant in the city of Vitória (ES)

The Sewage Treatment Plant of Federal University of Espírito Santo (STP-UFES) is located in university camp of Goiabeiras, Vitória (ES). The technology of treatment of this STP consist in the set association of anerobics reactors of UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) type and submersed aered biofilters constituing in a biological process that makes the treatment of sewage at secondary level. Such research propose preliminarly evaluate the ecotoxicological features of the crude sewage and the treated sewage of the STP-UFES, through the utilization of bioassays with embryos of *Crassostrea rhizophorae* oyster, and still examine the efficiency of the STP in terms of toxic reduction of the system over oyster embryony development. Adults animals collected in clean areas were utilized for obtainment of embryos, that were exposed at different concentrations of compost samples of crude and treated sewage in a period of 24 hours. After this period, it was counted the numbers of embryos, normal larvae and abnormal larvae. With the datas obtained, was determined the

*Corresponding author: Rafael Almeida Magris, e-mail: ra_magris@yahoo.com.br.

EC₅₀ through the Trimmed Spearman-Kärber method. It was noticed the occurrence of different types of abnormalities involving the bad formation of shell or the retarded development inside the expected time. The EC₅₀ obtained for the crude sewage was 13.02% and for the treated sewage 25.73%. The founded values indicated that exist a severe harmful effect of the crude and treated sewages over the embryo-larval development of *C. rhizophorae* oyster. The STP-UFES presents a low efficiency in removal of toxicity indicating that likely toxins persist in the treatment, being responsible for the remaining toxicity. The utilization of tests of toxicity with embryos of oyster showed be appropriate for evaluate the STP's efficiency because they respond at a harmful action as a whole and for have been self presented as highly sensitive.

Key words: toxicity test, crude sewage, treated sewage, STP, *Crassostrea rhizophorae*.

INTRODUÇÃO

Os despejos de esgotos de origem doméstica constituem uma das formas mais comuns de poluição e têm causado agudas e incidiosas alterações nas comunidades bióticas e habitats (Borrely *et al.*, 2000). Nos países em desenvolvimento, este problema tem caráter ainda mais fundamental, já que a minoria dos resíduos urbanos é objeto de algum tratamento e apenas uma pequena proporção de tal tratamento responde a uma norma de qualidade aceitável (Chernicharo, 1997).

Deste modo, há a necessidade urgente do aumento da competência institucional para o monitoramento rápido de áreas costeiras sujeitas aos despejos de esgotos domésticos. Neste âmbito, a ecotoxicologia representa uma ferramenta poderosa para advertir sobre a contaminação dos ambientes aquáticos e o comprometimento da manutenção da vida aquática.

Os estudos sobre controle de toxicidade nos sistemas de tratamento de esgotos são escassos, e a maioria dos profissionais em saneamento desconhece não só os fundamentos técnico-científicos destes experimentos, como também os métodos disponíveis para avaliação da toxicidade (Branco, 1986). Este trabalho tem por objetivo avaliar a toxicidade do esgoto bruto e tratado de uma estação de tratamento de esgotos (ETE) de

Vitória (ES) e ainda verificar a eficiência da estação em termos de redução do efeito tóxico do sistema sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *Crassostrea rhizophorae*, representando uma abordagem complementar e pioneira na caracterização dos esgotos no Estado do Espírito Santo.

MATERIAL E MÉTODOS

O canal da Passagem faz parte do sistema estuarino da Baía de Vitória, representando a ligação entre esta e a Baía do Espírito Santo. Apresenta extrema importância econômica para a região da Grande Vitória e abriga extensa área de manguezal que o margeia. Apesar disso, este canal tem sido usado como corpo receptor de efluentes domésticos tanto brutos como tratados por estações de tratamento de esgotos, incluindo o da ETE-UFES, localizada no Campus Universitário de Goiabeiras, em Vitória, ES (Figura 1).

A ETE-UFES apresenta a mais compacta tecnologia de tratamento de esgotos sanitários disponível atualmente no Brasil, consistindo na associação em série de reatores anaeróbios do tipo UASB (Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente) e biofiltros aerados submersos, constituindo-se em um processo biológico que realiza o tratamento de esgoto em nível secundário.

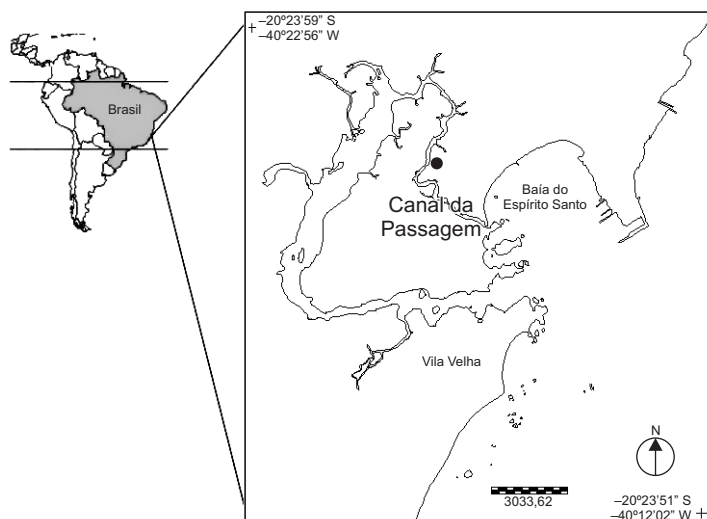


Figura 1 — Localização da ETE-UFES no Campus Universitário de Goiabeiras, em Vitória, ES. A seta indica localização da ETE.

As amostras de esgotos brutos e tratados foram obtidas em três períodos do dia (8, 14 e 20 horas), coletando-se 1 litro de cada tipo de esgoto por amostragem, sendo posteriormente mantidas sob refrigeração, a 4°C. Na ocasião da realização dos testes, foi preparada uma amostra composta de cada tipo de esgoto, constituída de alíquotas de cada horário da coleta e com volumes proporcionais à vazão informada pela estação. A salinidade das amostras de esgoto foi elevada a 28 pela utilização de salmoura, preparada pela concentração da água do mar natural através de evaporação lenta (= 40°). A determinação do volume necessário para o ajuste foi calculada através da fórmula de Salomão (1978), descrita em Nascimento (2002).

Para a realização do teste de toxicidade, foi utilizada metodologia padronizada por Nascimento (2002). Ostras adultas foram coletadas em áreas não poluídas, sendo limpas, para ficarem livres de organismos incrustantes, e colocadas por uma noite em água do mar filtrada sob aeração constante. Na manhã seguinte, coletaram-se artificialmente os embriões, através da retirada de ovócitos e espermatozóides dos poros genitais com auxílio de pipetas Pasteur. Após fertilização, os embriões foram contados em câmara de Sedgwick-Rafter, e foram realizados os cálculos necessários para obter, nos recipientes-teste, 1.000 embriões/100 ml, em água do mar filtrada e esterilizada nas condições prescritas.

Para este teste foram utilizadas quatro concentrações de esgoto bruto (10%, 25%, 50% e 70%) e do tratado (10%, 25%, 50% e 70%), com três réplicas para cada concentração. Além dessas soluções, foram usados dois grupos controle contendo somente água de diluição (água do mar natural, filtrada e esterilizada), com três réplicas cada. A substância de referência utilizada foi o DSS (0,0; 0,32; 0,56; 1,0; 1,8; e 3,2 mg/L).

Foi empregada uma réplica adicional da menor e da maior concentração para determinação de parâmetros físico-químicos (temperatura, OD, pH), obtidos com multiparâmetro portátil YSI85, no início e final do teste.

Após manutenção dos recipientes-teste em incubadora na temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas de exposição, foram removidas de cada recipiente-teste duas alíquotas de 10 ml que foram preservadas com formalina neutra a 4%, em tubos de ensaio fechados. A partir daí, foram contados o número de embriões, larvas normais e anormais entre os 100 primeiros organismos encontrados em cada tubo.

Com os dados obtidos, foi determinada a CE_{50} dos dois tipos de esgotos, e as diferenças no percentual de anormalidades entre os diferentes tratamentos e entre as réplicas foram testadas estatisticamente usando análises de variância (ANOVA). A comparação dos tratamentos entre si foi efetuada pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise qualitativa das amostras do controle, comparada com aquelas submetidas aos testes com esgoto bruto e esgoto tratado, permitiu examinar os diferentes tipos de anormalidades, com características específicas e bem definidas, envolvendo a malformação da concha e o desenvolvimento retardado, no caso dos embriões. Os tipos de anormalidades mais frequen-

temente encontrados estavam caracterizados por larvas com reentrância em uma das valvas da concha, larvas com concha de formato oval, larvas com extrusão do velum, larvas com depressão na região do umbo e larvas com concha completamente descaracterizada.

A Figura 2 ilustra o percentual médio de anormalidades observado no teste com embriões da ostra expostos 24 horas a diferentes diluições de esgoto bruto e tratado da ETE-UFES.

Os valores dos parâmetros ecotoxicológicos mostram efeito nocivo severo das amostras de esgoto bruto e tratado sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* (Tabela 1). Isto é evidenciado pelos baixos valores de CE_{50} encontrados em ambos os tipos de esgotos.

Comparando-se os valores da CE_{50} do esgoto bruto ($CE_{50} = 13,02\%$) e do efluente da ETE ($CE_{50} = 25,73\%$) nota-se baixa eficiência na remoção da toxicidade dos esgotos que chegam à estação. Isso indica preliminarmente que os prováveis agentes tóxicos persistem ao tratamento propiciado pela ETE e são responsáveis pela toxicidade remanescente.

Após verificação dos dados com relação ao teste de normalidade, a Análise de Variância revelou diferença significativa entre os tratamentos, correspondendo às diferentes concentrações ($p < 0,05$) em ambos os tipos de esgotos. Por sua vez, não houve diferença significativa entre as réplicas de cada tratamento ($p > 0,05$), sendo estas atribuídas a fenômenos aleatórios. O teste de Tukey apontou que tanto no esgoto bruto quanto no tratado existem diferenças assinaláveis entre todos os tratamentos, com exceção das concentrações de 50% e 70%, que não apresentaram diferenças significativas no percentual médio de anormalidades no nível de 5% de significância.

Embora a configuração da ETE-UFES apresente bom desempenho na remoção dos parâmetros convencionais, como as eficiências médias da ordem de 94% na remoção de sólidos em suspensão, 95% na remoção de DBO_5 e 88% na remoção de DQO, não há correlação evidente na eficiência da remoção dos componentes tóxicos.

Esses resultados podem indicar que, na prática, os sistemas públicos de esgotos, além de receberem os despejos líquidos provenientes dos usos da água para higiene e necessidades fisiológicas, estão sujeitos a receberem efluentes de pequenos estabelecimentos comerciais com características distintas dos efluentes domésticos, representando danos ao ambiente.

Resultados semelhantes na comparação da relação entre os parâmetros ecotoxicológicos e os parâmetros convencionais de monitoramento de ETES foram obtidos por Silva *et al.* (2000), que observaram na ETE do Balneário Camboriú baixa eficiência na remoção da toxicidade, mesmo alcançando boa eficiência na remoção de matéria orgânica.

Desta forma, as ETES representam fontes potenciais de contaminantes tóxicos para o ambiente aquático, sendo necessário o controle de seus efluentes através da efetivação de um plano de monitoramento que sirva como instrumento de controle e comprovação da qualidade da disposição final de esgotos, levando em consideração os parâmetros elucidados no presente trabalho e evitando conseqüências desastrosas para o meio ambiente.

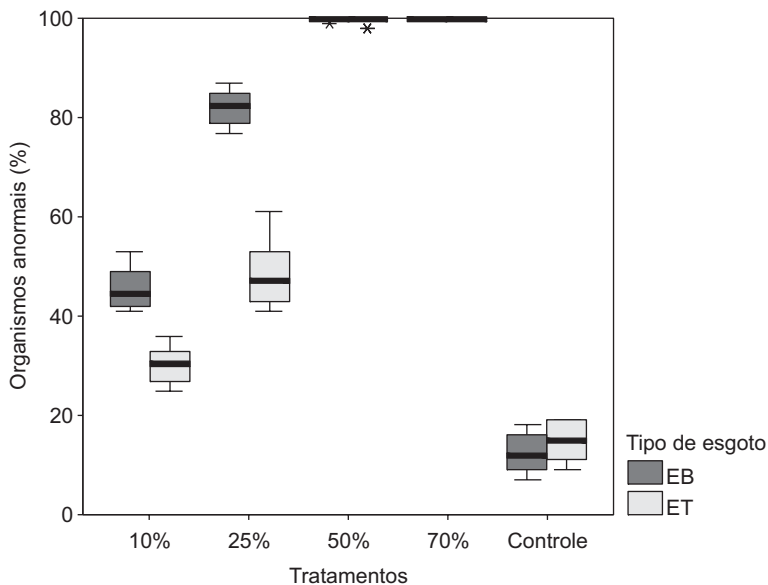


Figura 2 — Box plot da percentagem de organismos anormais nas diferentes concentrações das amostras de esgotos bruto e tratado e nos controles. EB – esgoto bruto; ET – esgoto tratado.

Tabela 1 — Valores da CE_{50} (%) (e seus respectivos intervalos de confiança) e unidades tóxicas para os dois tipos de esgotos.

Tipo de esgoto	CE_{50} (%)		Unidades tóxicas
	Intervalo mín.-máx. (95% confiança)		
Esgoto bruto	13,02 (12,19-13,90)		7,68
Esgoto tratado	25,73 (24,49-27,03)		3,89

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORRELY, S. I., TORNIERI, P. H. & SAMPA, M. H. de O., 2000, Avaliação da toxicidade aguda em efluentes industriais, afluentes e efluentes de Estação de Tratamento de Esgotos. In: E. L. G. Espíndola *et al.* (eds.), *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RiMa Editora, São Carlos.
- BRANCO, S. M., 1986, *Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária*. CETESB/Ascetesb, São Paulo, Brasil, 76p.
- CHERNICHARO, C. A. L., 1997, *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG, Belo Horizonte, Brasil, 246p.
- NASCIMENTO, I. A., 2002, Testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). In: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa & M. Nipper (eds.), *Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas e Industrial Ltda, São Paulo, cap. VI, pp. 73-81.
- SILVA, A. Z., RÖRIG, L. R. & RESGALLA JR. C., 2000, Determinação do efeito do esgoto bruto e efluente da Estação de Tratamento de Esgotos do Balneário de Camboriú (SC) sobre o crescimento de *Skeletonema costatum* (Baccilariophyceae). In: E. L. G. Espíndola *et al.* (eds.), *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RiMa Editora, São Carlos.



Comparação dos Efeitos do Material Particulado em Suspensão (PTS) Colhido em Diferentes Fontes Emissoras de Poluentes sobre a Embriogênese em Ovos de Galinha

D. C. AZEVEDO,* D. S. OLIVEIRA, H. M. B. GUIMARÃES, R. S. L. MARTINS,
M. MACCHIORE & P. H. N. SALDIVA

LIM 05 – Laboratório de Poluição Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,
Av. Dr. Arnaldo, 455, 1º andar, sala 1226, Cerqueira César, São Paulo, SP

RESUMO

Partículas em suspensão no ar atmosférico são responsáveis pelos efeitos adversos à saúde, podendo provocar malformações embrionárias. O presente estudo compara a embriotoxicidade de amostras de material particulado em suspensão (PTS) de três perfis de fontes emissoras de poluentes: São Paulo, Capital; Cubatão; e Araraquara. Foram utilizados ovos recém-fecundados de *Gallus domesticus* divididos em: controle negativo, expostos ao PTS e controle positivo. Os ovos foram abertos e analisadas as taxas de mortalidade e peso. A taxa de mortalidade dos ovos expostos ao PTS de Cubatão foram as maiores (41,7%), em relação a Araraquara (37,5%) e a São Paulo (9,1%), na dose de 0,3 µg/L ($p < 0,05$). A média dos pesos daqueles que sobreviveram foi menor entre os expostos ao PTS de Cubatão, comparados aos de São Paulo e Araraquara. Esses dados revelam que não apenas as concentrações do PTS interferem no desenvolvimento embrionário, mas também os componentes, visto que a maior mortalidade e a menor média de peso encontram-se na amostra de Cubatão.

Palavras-chave: poluição, material particulado em suspensão (PTS), embriogênese, teratogênese.

ABSTRACT

Comparison of particulate suspended matter (PSM) effects from different pollution sources on chicken egg embryogenesis

Airborn particles are due to adverse effects on health and may cause adverse fetal outcomes. The present study compares the embryotoxicity of the PTS (Total Suspended Particulate) from three different emitting pollution sources: São Paulo, Capital; Cubatão; and Araraquara. Chicken fertilized eggs were divided on: nontreatment control, PTS treated and positive control. The eggs were opened and analyzed the mortality rates and weight of the embryos. The mortality rates of the PTS treated eggs were the highest on Cubatão (41.7%) followed by Araraquara (37.5%) and São Paulo (9.1%) at 0.3 µg/L PTS dose ($p < 0.05$). The mean weight from hatching embryos were lower at Cubatão PTS treated when compared with São Paulo and Araraquara. These observations are supportive of the concept that not only the concentration of PTS interferes on embryo development, but also their components, therefore the highest mortality and the lower mean weight belong to Cubatão sample.

Key words: air pollution, total suspended particulate (PTS), embryogenesis, teratogenesis.

INTRODUÇÃO

A exposição à poluição atmosférica de grandes centros, como a cidade de São Paulo, tem merecido a atenção de muitos estudos, uma vez que efeitos adversos à saúde têm sido observados em exposições com níveis de concentrações abaixo dos considerados seguros (Saldiva *et al.*, 1992, 1994, 1995).

Partículas atmosféricas são componentes importantes da poluição atmosférica. São constituídas de materiais orgânicos e inorgânicos que podem ser gerados através de processos de combustão. O material particulado tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que sua toxicidade está relacionada não somente à concentração, mas também à natureza química da partícula e sua composição. Assim, podemos afirmar que uma

*Corresponding author: Sandro Estevan Moron, e-mail: sandromoron@uol.com.br.

mesma concentração de aerossol de combustão de biomassa, como, por exemplo, a resultante da queima de palha de cana-de-açúcar, e a fuligem de exaustão de automóveis devem emitir diferentes toxicidades, assim como as partículas exaladas das chaminés de indústrias petroquímicas podem ser ainda mais tóxicas. O material particulado pode ser formado por substâncias como sulfatos, nitratos, amônia, cloro e carbono, elementos-traço como chumbo, cádmio e mercúrio, bem como alguns metais de transição como o ferro e materiais biológicos, dependendo do tipo de material do qual se originaram (Gilmour et al., 1996; Harrison & Yin, 2000; Cerná et al., 2000).

Tanto estudos epidemiológicos quanto experimentais mostram que a exposição à poluição atmosférica diminui o desenvolvimento pré e perinatal. Pereira et al. (1998) mostraram associação significativa entre mortalidade intra-uterina e concentrações de poluição atmosférica na cidade de São Paulo. Em um seguimento desse trabalho, verificou-se que, em dias em que a poluição atingia níveis elevados, havia aumento importante do nível de carboxihemoglobina no cordão umbilical dos recém-nascidos. Além dos efeitos observados em humanos, a poluição atmosférica, quando atinge áreas silvestres, traz alterações ao desenvolvimento embrionário de animais (Hui, 2002).

A visão de que a placenta oferecia proteção total contra os agentes externos foi questionada a partir do incidente com o uso da Talidomida por gestantes. Utilizado na prevenção de êmese gravídica, causou diversas anomalias fetais, como desenvolvimento anormal dos membros e face, deficiências cardíacas e renais, entre outras, comprovando o efeito teratogênico de algumas substâncias (Koren, 1998; Moore, 2000).

No Brasil, exemplo de anomalias fetais devido a agentes externos ocorreu na cidade de Cubatão, importante pólo petroquímico, onde foi detectada associação entre o nascimento de crianças malformadas, apresentando especialmente anencefalia, e a poluição industrial daquela região, na década de 1980 (Rabello-Gay et al., 1991).

Assim, temos que tanto a Talidomida quanto a poluição industrial de Cubatão são compostos teratogênicos, uma vez que podem provocar malformações ou aumentar a incidência de anomalias. No humano, o período de maior suscetibilidade a um teratógeno vai desde a terceira até a oitava semana de gestação, período no qual ocorre a diferenciação celular. Entretanto, se o teratógeno atuar no início da embriogênese pode acarretar a morte do feto (Moore, 2000). As manifestações mais comuns de teratogênese estão restritas à morte do feto, carcinogênese e malformações (Koren, 1998).

Apesar da dificuldade em transpor a fetos humanos as lesões causadas em animais (Koren, 1998), modelos experimentais com embriões de galinha constituem a melhor ferramenta para descobrir os possíveis efeitos teratogênicos de substâncias, pois possuem rápido desenvolvimento embrionário (20 a 21 dias), têm desenvolvimento embrionário

externo, ou seja, o ovo fora do corpo materno, o que facilita a sua manutenção, e fácil técnica experimental (processo de exposição ao PTS), além de ser um modelo experimental de embrião reconhecido pela comunidade científica, quando se trata de estudos envolvendo a teratogênese (Guimarães, 2004).

Considerando que o material PTS colhido em três municípios distintos (Cubatão, Araraquara, São Paulo) possa ter diferente toxicidade, devido à natureza do material particulado resultante da combustão proveniente de cada um deles, o presente estudo analisou e comparou os possíveis efeitos teratogênicos destes sobre embriões de *Gallus domesticus*, identificando quais concentrações de cada amostra são mais agressivas ao desenvolvimento do embrião, e diferenciou o grau de teratogenicidade pelo local proveniente da amostra.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material particulado

O material particulado (PTS) foi coletado em três municípios diferentes: na atmosfera do prédio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, região da capital paulista de intenso tráfego de veículos automotores (Cetesb, 2002); atmosfera proveniente da queima de cana-de-açúcar (biomassa) na região de Araraquara, interior do Estado de São Paulo; e atmosfera do pólo petroquímico de Cubatão. A coleta do material foi de 24 horas, em sistemas de Amostradores de Médio Volume, sendo todo material aproveitado. Após a coleta, o material particulado foi diluído em soro fisiológico (Ameenuddin & Sunde, 1984). O material particulado diluído em soro foi agitado em um sonicador por 60 minutos. Após a homogeneização, a amostra foi diluída em concentrações diferentes conhecidas, 0,03 e 0,3 µg/L, utilizadas durante os experimentos.

A análise do material particulado foi realizada através do método de ativação de nêutrons, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo.

Tratamento dos embriões

Os experimentos foram executados em três etapas, cada uma realizada com o material PTS recolhido de cada município de estudo. Foram utilizados ovos recém-fecundados, 120 ovos para cada uma das etapas, nos seguintes grupos:

- grupo intacto (controle negativo) – 15 ovos não inoculados;
- grupo salina (controle negativo) – 15 ovos inoculados com 0,3 ml de salina (0,9%);
- grupos com tratamento de inoculação – 0,3 ml de solução PTS a 0,03 µg/L; 0,3 ml de solução PTS a 0,3 µg/L;
- grupo Ciclofosfamida (controle positivo) – 15 ovos inoculados com 0,3 ml de solução de Ciclofosfamida a 0,017 mg/ml (Gilani & Chatzinoff, 1982).

Ciclofosfamida é uma droga sintética utilizada na terapia de câncer e que sabidamente causa malformações de esqueleto e tecidos em embriões (IARC, 1972).

Com exceção do grupo intacto, os ovos foram inoculados com suas respectivas soluções, no terceiro dia de formação embrionária, considerando como tempo zero a fecundação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que, na dose de 0,3 µg/L, a solução PTS de Cubatão obteve a menor média de peso; já entre São Paulo e Araraquara, as médias não apresentaram diferença estatisticamente significativa, conforme exposto na Figura 1.

Em relação à viabilidade de sobrevivência após a eclosão, temos que os ovos expostos ao material PTS de Cubatão

obtiveram a maior mortalidade (41,7%), em Araraquara foi intermediária (37,5%) e em São Paulo foi a menor verificada (9,1%), na dose de 0,3 µg/L, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 2).

Os filtros utilizados no preparo das soluções foram enviados para o IPEN, e a análise foi feita pela Dra. Mitiko Saiki, usando o método de ativação de nêutrons (Tabela 1). Constata-se que alguns elementos estão presentes somente em Cubatão, principalmente urânio, que sabidamente tem efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário, além de ser mutagênico e carcinogênico (Durakovic, 1999). Diante dos resultados aqui expostos, pode-se dizer que não apenas as concentrações do PTS interferem no desenvolvimento embrionário, mas também os componentes, visto que a maior mortalidade e a menor média de peso encontram-se na amostra de Cubatão.

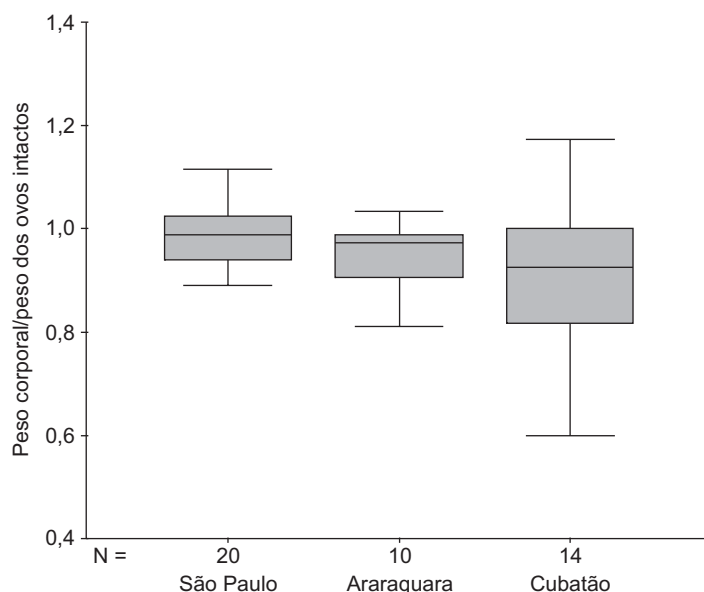


Figura 1 — Peso dos embriões ao nascimento.

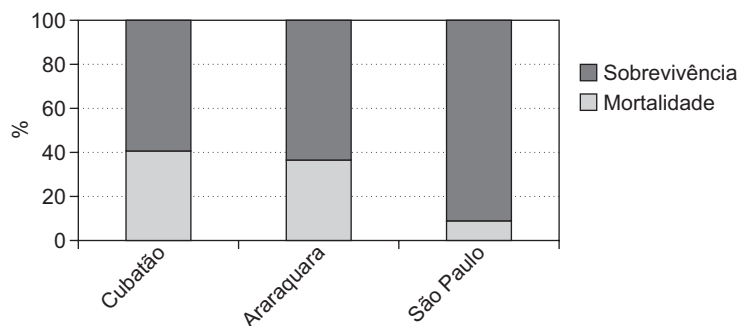


Figura 2 — Sobrevivência e mortalidade dos embriões (em %).

Tabela 1 — Elementos químicos da análise dos filtros.

Elemento	Amostra PTS Cubatão	Amostra PTS São Paulo	Amostra PTS Araraquara
Ca, $\mu\text{g m}^{-3}$	79,9 \pm 1,5	Não detectado	Não detectado
Ni, $\mu\text{g m}^{-3}$	0,12 \pm 0,02	Não detectado	Não detectado
U, ng m^{-3}	17,14 \pm 0,05	Não detectado	Não detectado
Ce, ng m^{-3}	841 \pm 5	Não detectado	Não detectado
Nd, ng m^{-3}	311 \pm 57	Não detectado	Não detectado
Sm, ng m^{-3}	47,08 \pm 0,05	Não detectado	Não detectado
Tb, ng m^{-3}	3,86 \pm 0,05	Não detectado	Não detectado

Agradecimentos — CNPq, pela concessão de bolsa de iniciação científica 2003-2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMEENUDDIN, S. & SUNDE, M. L., 1984, Sensitivity of chick embryo to various solvents used in egg injection studies. *Proc. of the Soc. for Experim. Biol. And Med.*, 175: 176-178.
- CERNÁ, M., POCHMANOVÁ, D., PASTORKOVÁ, A., BENES, I., LENICEK, J., TOPINKA, J. & BINKOVÁ, B., 2000, Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM10 particulates. *Mutat. Res.*, 469: 71-82.
- CETESB, 2002, *Relatório de qualidade do ar do Estado de São Paulo 2001*. Série Relatório – Secretaria do Estado do Meio Ambiente. CETESB, Sao Paulo. Disponível em: URL: <http://www.cetesb.sp.gov.br/AR>.
- DURAKOVIC, A., 1999, Medical effect of internal contamination with Uranium. *Croat. Med. J.*, 40(1): 49-66.
- GILANI, S. H. & CHATZINOFF, M., 1983, Embryopathic effects of Cyclophosphamide. *Environ. Res.*, 31: 296-301.
- GILMOUR, P. S., BROWN, D. M., LINDSAY, T. G., BESWICH, P. H., MACNEE, W. & DONALDSON, K., 1996, Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Ocup. Environ. Med.*, 53: 817-822.
- GUIMARÃES, H. M. B., 2004, *Avaliação do efeito tóxico do PM10 no desenvolvimento embrionário do Gallus Domesticus*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- HARRISSON, R. M. & YIN, J., 2000, Particulate matter in the atmosphere: which particulate properties are important for its effects on health? *Sci. Total Environ.*, 249: 85-101.
- HUI, C. A., 2002, Concentration of chromium, manganese, and lead in air and avian eggs. *Environ. Pollut.*, 120(2): 201-206.
- IARC, 1981, *Monographs on evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*. World Health Organization, Geneva, 1972 (multivolume work), 26: 176.
- KOREN, G., PASTUSZAK, A. & ITO, S., 1998, Drugs in pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, 16: 1128-37.
- MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N., 2000, *Embriologia clínica*. Guanabara Koogan, 543, 6. ed.
- PEREIRA, L. A., LOOMIS, D., CONCEIÇÃO, G. M., BRAGA, A. L. F., ÁREAS, R. M., KISHI, H. S., SINGER, J. M., BOHM, G. M. & SALDIVA, P. H. N., 1998, Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ. Health Persp.*, 6: 325-329.
- RABELLO-GAY, M. N., RODRIGUES, M. A. L. R. & MONTELEONE-NETO, R., 1991, *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese – métodos e critérios de Avaliação, Ribeirão Preto*. Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 246p.
- SALDIVA, P. H. N., KING, M., DELMONTE, V. L. C., MACCHIONE, M., PARADA, M. A. C., DALIBERTO, M. L., SAKAE, R. S., CRIADO, P. M. P., SILVEIRA, P. L. P., ZIN, W. A. & BOHM, G. M., 1992, Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ. Res.*, 57: 19-33.
- SALDIVA, P. H. N., LICHTENFELS, A. J. F. C., PAIVA, P. S. O., BARONE, I. A., MARTINS, M. A., MASSAD, E., PEREIRA, J. C. R., XAVIER, V. P. & BOHM, G. M., 1994, Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo: a preliminary report. *Environ. Res.*, 65: 218-225.
- SALDIVA, P. H. N., POPE II, C., SCHWARTZ, J., DOCKERY, D. W., LICHTENFELS, A. J. F. C., SALGE, J. M., BARONE, I. A. & BOHM, G. M., 1995, Air pollution and mortality in elderly people : a time series study in São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health.*, 50(2): 159-163.



SETAC – Brazil

Mutagenicidade do Sedimento e Estresse Oxidativo Hepático em Peixes sob a Influência de Curtumes

K. C. TAGLIARI,^{1,2} R. CECCHINI,³ J. A. VAZ ROCHA¹ & V. M. F. VARGAS^{1,2*}

¹FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler, Programa de Pesquisas Ambientais, Av. Dr. Salvador França, 1707, CEP 90690-000, Porto Alegre, RS

²PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS

³UEL – Universidade Estadual de Londrina, Depto. de Ciências Patológicas, C.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR

RESUMO

A mutagenicidade da água intersticial e a de extratos orgânicos do sedimento dos rios Cadeia e Feitoria foram avaliadas através do ensaio de microssuspensão em *Salmonella* utilizando as cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102, na ausência e presença de S9 mix. No local contaminado, as respostas para água intersticial foram mutagênicas ou indicativas dessa atividade, sugerindo presença de compostos mutagênicos causadores de substituição de pares de base e erros no quadro de leitura do DNA das linhagens estudadas, incluindo substâncias que geram estresse oxidativo. Os extratos orgânicos estudados apresentaram mutagênese direta ou indicativa em relação às linhagens TA97a, TA98 e TA100. De modo geral, a fração metabólica exógena diminuiu a mutagenicidade das amostras. Os fígados de *Gymnogeophagus gymnogenys*, família *Cichlidae*, coletados na área impactada, comparados aos do local não poluído, foram analisados quanto aos parâmetros de estresse oxidativo. Comparativamente aos controles, houve aumento significativo na atividade da superóxido dismutase (SOD), nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e na quimiluminescência das células hepáticas dos peixes da área poluída. A concentração dos citocromos P450 e b5 diminuiu significativamente nos peixes do local poluído em relação ao local de referência, enquanto a atividade da catalase não sofreu alteração. Foi possível correlacionar as alterações biológicas sofridas nos peixes expostos aos despejos de curtumes com a presença de compostos mutagênicos na água intersticial desse ambiente.

Palavras-chave: ensaio de microssuspensão em *Salmonella*, cromo, compostos orgânicos, sedimento, estresse oxidativo em peixes.

ABSTRACT

Sediment mutagenicity and liver oxidative stress in fish under tannery influence

The mutagenicity of interstitial water and organic extracts from the sediments in the Cadeia and Feitoria Rivers, RS, Brazil, were evaluated by *Salmonella* microsuspension bioassay using TA97a, TA98, TA100 and TA102 strains, in the absence and presence of S9 mix. At the contaminated site, the mutagenic responses for interstitial water, suggested the presence of frameshift and base pair substitution mutagens, including substances that generate oxidative stress. Organic extracts presented direct or indicative mutagenesis to the TA97a, TA98 and TA100 strains. In general, an exogenous metabolic systems decreased the mutagenicity of the samples. The livers of *Gymnogeophagus gymnogenys*, family *Cichlidae*, collected in this impacted area, compared to a non-polluted site, were analyzed for oxidative stress parameters. Compared to the controls, there was a significant increase in the activity of superoxide dismutase (SOD), levels of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), and in the chemiluminescence of hepatic cells in fish collected at the polluted area. The concentration of cytochromes P450 and b5 decreased drastically in the fish at the polluted site, while the catalase activity did not change. It was possible to correlate the biological changes in the fish with the presence of mutagenic compounds in interstitial water in this area.

Key words: *Salmonella* microsuspension bioassay, chromium, organic compounds, sediment, oxidative stress in fish.

*Corresponding author: Vera Maria Ferrão Vargas, e-mail: vvargas@brturbo.com.

INTRODUÇÃO

Compostos químicos provenientes de atividades antrópicas industriais, agrícolas e domésticas, quando liberados no ambiente sem tratamento adequado, constituem risco potencial para a saúde humana e a integridade dos ecossistemas. Atualmente, entre os testes de mutagenicidade mais utilizados em amostras ambientais estão os que usam microrganismos, em especial o teste *Salmonella*/microssoma (teste de Ames). O ensaio de microssuspensão em *Salmonella*, uma modificação do teste de Ames clássico, é sensível na detecção de mutagenicidade em diversos tipos de amostras. Além disso, esse ensaio permite a utilização de pequenas quantidades de amostras, de frações metabólicas hepáticas e de seus co-fatores, fatores importantes em estudos ambientais (Maron & Ames, 1983; Kado et al., 1983; Vargas et al., 1995). Os estudos de estresse oxidativo hepático em animais aquáticos fornecem parâmetros para biomonitoramento ambiental (DiGiulio et al., 1989; Bainy et al., 1996).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

As amostras de sedimento foram coletadas no inverno de 2000 e no verão de 2002, em dois arroios localizados no nordeste do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). Um ponto de amostragem escolhido, Arroio Feitoria – FEI001 (Figura 1), localiza-se nas proximidades de indústrias de curtume, além de estar sob influência agrícola e de esgotos domésticos em menor escala. O outro ponto, Arroio Cadeia – CAD006 (Figura 1), encontra-se em local considerado de referência, sem interferência de esgotos domésticos e industriais.

Os peixes foram coletados em abril, maio, julho e agosto de 2002, no Arroio Feitoria e na Lagoa Fortaleza (Figura 1), sendo a espécie *Gymnogeophagus gymnogenys*, família *Cichlidae*, escolhida por fornecer quantidade de fígado suficiente para as análises e por se alimentar frequentemente no substrato do rio.

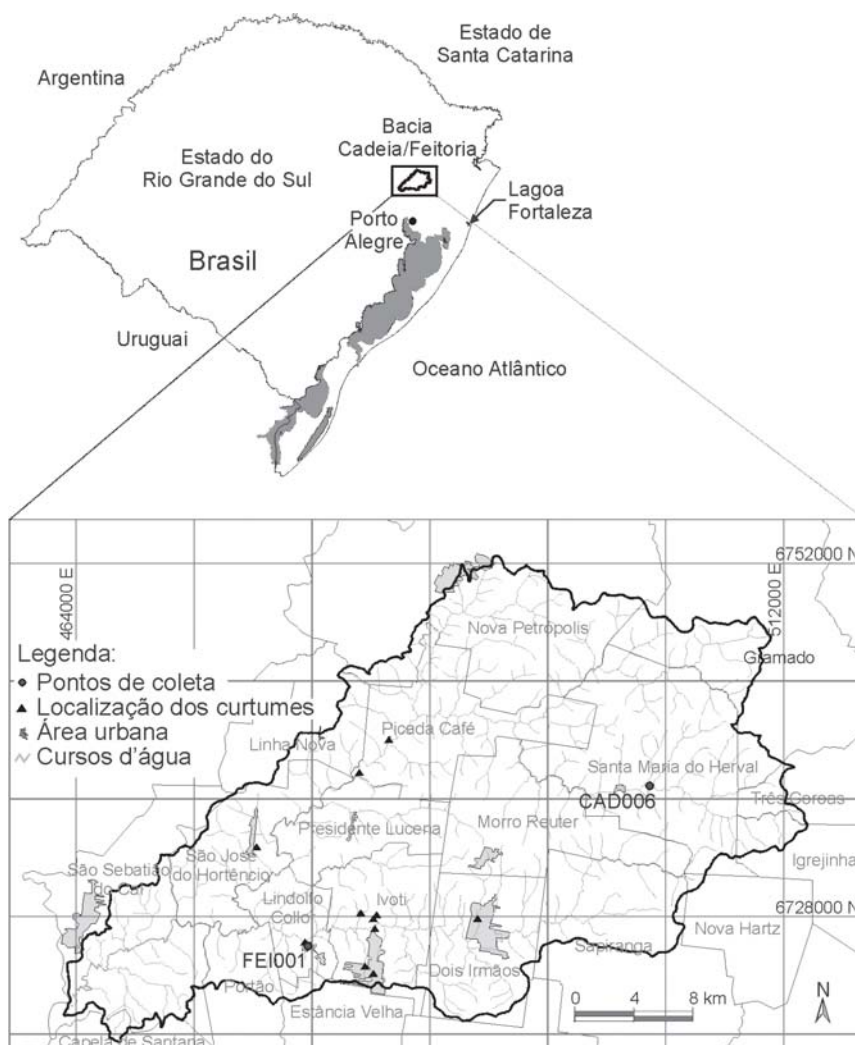


Figura 1 — Área de estudo com localização dos pontos de amostragem.

Extrações e ensaios

A água intersticial foi extraída das amostras de sedimento através de centrifugação a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Os extratos orgânicos das amostras de sedimento foram obtidos através de extração química, pela técnica de ultra-som com concentração em rota-vapor, utilizando o solvente diclorometano grau pesticida para extrair a fração moderadamente polar. As avaliações de mutagênese e citotoxicidade foram realizadas através do ensaio de microssuspensão em *Salmonella* (Kado *et al.*, 1983), nos volumes de 50, 100, 150, 200, 300 e 400 µl/placa para água intersticial e de 2,5, 10, 40 e 80 µg/placa para os extratos orgânicos. Os ensaios foram realizados com as cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, para as amostras de água intersticial, e com TA97a, TA98 e TA100, para as amostras de extratos do inverno, em presença e ausência de ativação metabólica (fração S9 de fígado de rato).

A amostra foi considerada positiva quando o valor da mutação induzida foi o dobro da atividade mutagênica observada no controle negativo e quando houve relação significativa na curva dose-resposta avaliada pelo programa SALMONEL (Myers *et al.*, 1991). Quando somente um dos critérios citados foi observado, a amostra foi considerada como indicativa de atividade mutagênica. No teste de viabilidade celular, as respostas foram consideradas citotóxicas quando a porcentagem de sobrevivência na amostra foi menor que 60% da observada no controle negativo.

Os fígados dos peixes capturados foram extraídos e armazenados como "pool" em nitrogênio líquido até o momento dos ensaios. A obtenção da fração microssomal hepática, utilizada na determinação espectral dos citocromos P450 e b5 (Omura & Sato, 1964) e da fração sobrenadante, usada na avaliação das atividades da superóxido dismutase – SOD (Marklund & Marklund, 1974) e da catalase – CAT (Aebi,

1984), foi realizada através de centrifugações sequenciais (Cecchini *et al.*, 1990). A quimiluminescência (Flecha *et al.*, 1991) e a lipoperoxidação hepáticas (Oliveira & Cecchini, 2000) também foram incluídas na avaliação do estresse oxidativo do *G. gymnogynys*. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste-t de Student através de programa computadorizado (GraphPad InStat, GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras de água intersticial do FEI001, foi observada mutagenicidade significativa (Renque 2) tanto no inverno como no verão para as linhagens TA98, TA100 e TA102, em ensaios diretos (Figura 2). As respostas foram negativas (Renque 0) para TA97a, sem e com S9mix. As amostras de verão do CAD006 apresentaram indícios de mutagenicidade (Renque 1), utilizando a TA102, na ausência e presença de S9mix. Quanto aos extratos orgânicos (Figura 3), as amostras de inverno do FEI001 apresentaram mutagenicidade positiva (Renque 2) para a linhagem TA97a e indícios dessa atividade nas linhagens TA98 e TA100 (Renque 1), em ensaios diretos. Após utilização de metabolismo exógeno, a mutagenicidade da maioria das amostras foi diminuída. Nenhuma das amostras apresentou citotoxicidade com ambos os tratamentos.

Comparativamente aos controles (Lagoa Fortaleza), houve aumento significativo na atividade da SOD, da lipoperoxidação detectada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e na quimiluminescência das células hepáticas de *G. gymnogynys* coletados no FEI001 (Tabela 1). Além disso, houve drástico decréscimo na concentração dos citocromos P450 e b5 nos peixes do local poluído em relação à área controle, enquanto não houve alteração significativa na atividade da catalase.

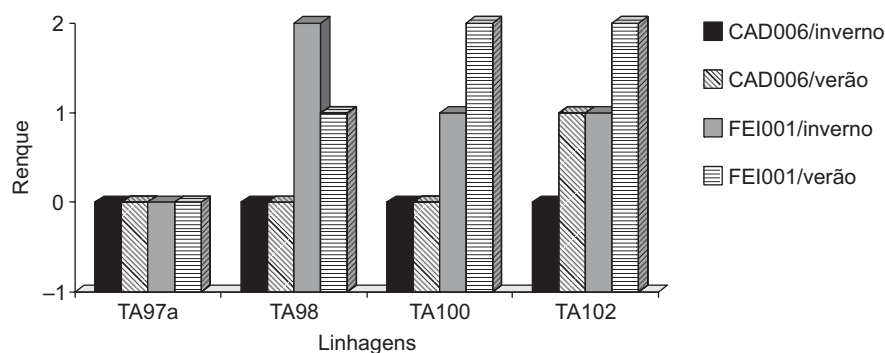


Figura 2 — Renque de mutagenicidade direta das amostras de água intersticial dos Arroios Cadeia e Feitoria, no inverno e verão. Renque de mutagenicidade baseado na mutação induzida e na curva dose-resposta (revertentes/µl de água intersticial) avaliadas pelo programa SALMONEL (Myers *et al.*, 1991), em que Renque 0 = sem mutagenicidade; Renque 1 = indícios de mutagenicidade; Renque 2 = mutagenicidade significativa.

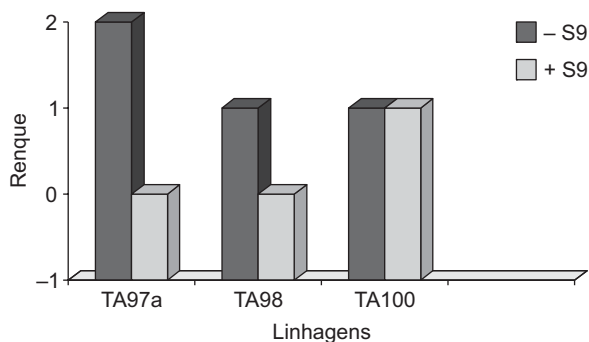


Figura 3 — Renque de mutagenicidade das amostras de inverno de extratos orgânicos do Arroio Feitoria, na ausência (– S9) e presença (+ S9) de metabolismo exógeno. Renque de mutagenicidade baseado na mutação induzida e na curva dose-resposta (revertentes/ μ g de extrato orgânico) avaliadas pelo programa SALMONEL (Myers *et al.*, 1991), em que Renque 0 = sem mutagenicidade; Renque 1 = indícios de mutagenicidade; Renque 2 = mutagenicidade significativa.

Tabela 1 — Parâmetros avaliados no fígado de peixes (*Gymnogeophagus gymnogenys*) coletados na Lagoa Fortaleza, Cidreira, RS, e no Rio Feitoria, Lindolfo Collor, RS.

Parâmetros ^a	Media \pm s.d. ^b		Análises estatísticas (p) ^c
	Lagoa	Rio	
CITOCROMO P450 (nmol/mg proteína)	0,22 \pm 0,056	N.D.	–
CITOCROMO b5 (nmol/mg proteína)	0,32 \pm 0,027	0,17 \pm 0,080	0,037
CATALASE (\neq ABS/mg proteína)	7,84 \pm 0,481	8,77 \pm 0,007	0,224
SUPERÓXIDO DISMUTASE (U/mg proteína)	38,50 \pm 0,810	74,75 \pm 2,40	0,002
TBARS (nmol TBARS/mg proteína)	0,37 \pm 0,150	0,79 \pm 0,348	0,035
QL (máxima cpm/mg proteína)	95255 \pm 24596	164244 \pm 21609	< 0,0001

^aOs citocromos P450 e b5 foram expressos em nmol por mg de proteína; a catalase, como diferença de absorbância (\neq ABS) por mg de proteína; a SOD, como unidades (U) por mg de proteína; TBARS, como nmol de TBARS por mg de proteína; e a quimiluminescência, como cintilações por minuto por mg de proteína.

^bLagoa Fortaleza (pool = 41 animais); rio Feitoria (pool = 60 animais). Para cada parâmetro foram realizadas 6 repetições e, portanto, o SD está relacionado à metodologia de repetição.

^cTeste t de Student não pareado; quando os SDs das médias foram diferentes, foi aplicado o teste alternativo de Welch. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05$.

A mutagenicidade ou seus indícios em amostras de água intersticial e extrato orgânico, nas cepas avaliadas, demonstra a presença de substâncias capazes de modificar o deslocamento do quadro de leitura e de substituir pares de bases no DNA, incluindo compostos oxidantes detectados pela TA102. As amostras de água intersticial do FEI001 mostraram atividade mutagênica ou indícios dessa ação de forma mais acentuada

sem ativação metabólica, com diminuição da mutagenicidade após o uso de S9mix. Em estudos com metais pesados, principalmente na avaliação de cromo hexavalente, foram encontrados resultados semelhantes (Bianchi *et al.*, 1983; DeFlora *et al.*, 1984), sugerindo a presença desse metal na água intersticial do FEI001. Entretanto, a mutagenicidade encontrada nos extratos orgânicos do FEI001 sugere contribuição de com-

postos mutagênicos de natureza moderadamente polar como os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs). A detecção da mutagenicidade no FEI001 indica os riscos biológicos a que a flora e a fauna estão expostas nesse ecossistema. Utilizando *G. gymnogenys* como biomarcadores de poluição aquática foi possível verificar que os animais do FEI001 (área poluída), em relação aos animais do local de referência, estão sofrendo estresse oxidativo hepático de forma semelhante aos resultados encontrados em peixes inoculados com dicromato de potássio (Tagliari *et al.*, 2004). Essas evidências concordam com o diagnóstico de mutagenicidade na água intersticial do FEI001 e indicam a presença de compostos oxidativos como o cromo no local. Esses resultados indicam a complexidade de substâncias reativas presentes em uma amostra ambiental e permitem ações preventivas e mitigadoras.

Agradecimentos — Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Dr. Luiz Roberto Malabarba, aos Mestres Getúlio Dornelles e Rubem C. Horn, a Eliana C. Sarmento e Lílian W. Ferraro, à equipe de coleta da FEPAM, aos técnicos da UEL e ao Prof. Bruce N. Ames. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul e Financiadora de Estudos e Projetos (PADCT/FINEP, no. 77.97.1116.00) e apoiado pela FEPAM e PUCRS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H., 1984, Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, 105: 121-126.
- BAINY, A. C. D., SAITO, E., CARVALHO, P. S. M. & JUNQUEIRA, V. B. C., 1996, Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.*, 34: 151-162.
- BIANCHI, V., CELOTTI, L., LANFRANCHI, G., MAJONE, F., MARIN, G., MONTALDI, A., SPONZA, G., TAMINO, G., VENIER, P., ZANTEDESCHI, A. & LEVIS, A. G., 1983, Genetic effects of chromium compounds. *Mutat. Res.*, 117: 279-300.
- CECCHINI, R., ARUOMA, O. I. & HALLIWELL, B., 1990, The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes, liposomes or from DNA damage by bleomycin or phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Radical Res. Comms.*, 10: 245-258.
- DE FLORA, S., ZANACCHI, P., CAMOIRANO, A., BENNICELLI, C. & BADOLATI, G. S., 1984, Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutat. Res.*, 133: 161-198.
- DI GIULIO, R. T., WASHBURN, P. C., WENNING, R. J., WINSTON, G. W. & JEWELL, C. S., 1989, Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 1103-1123.
- FLECHA, B. G., LLESUY, S. & BOVERIS, A., 1991, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.*, 10: 93-100.
- KADO, N. Y., LANGLEY, D. & EISENSTADT, E., 1983, A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.*, 121: 25-32.
- MARKLUND, S. & MARKLUND, G., 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47: 469-474.
- MARON, D. M. & AMES, B. N., 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215.
- MYERS, L. N., ADAMS, L., KIER, T. K., RAO, B., SHAW, B. & WILLIAMS, L., 1991, Microcomputer software for data management and statistical analyses of the Ames/*Salmonella* test. In: D. Krewski (ed.), *Statistical methods in toxicological research*. Gordon and Brech, New York.
- OLIVEIRA, F. J. de A. & CECCHINI, R., 2000, Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *J. Parasitol.*, 86: 1067-1072.
- OMURA, T. & SATO, R., 1964, The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239: 2370-2378.
- TAGLIARI, K. C., VARGAS, V. M. F., ZIMIANI, K. & CECCHINI, R., 2004, Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 17: 149-157.
- VARGAS, V. M. F., GUIDOBONO, R. R., JORDÃO, C. & HENRIQUES, J. A. P., 1995, Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutat. Res.*, 343: 31-52.



SETAC - Brazil

Toxicidade de Resíduos Têxteis Tratados por Microrganismos

P. M. DELLAMATRICE & R. T. R. MONTEIRO*

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Laboratório de Ecotoxicologia, C.P. 96, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

RESUMO

A biodegradação do efluente e resíduo sólido da Estação de Tratamento de Esgoto da cidade de Americana, SP (DAE Americana), a qual trata 400 L s⁻¹ de esgoto municipal junto com efluentes de 43 indústrias têxteis, foi estudada utilizando diversos microrganismos, como cianobactérias e fungos basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, e também em sistema anaeróbio. A toxicidade foi determinada utilizando como bioindicadores *Hydra attenuata*, a alga *Selenastrum capricornutum* e sementes de alface (*Lactuca sativa*). A degradação do efluente foi eficiente para descoloração e toxicidade. A descoloração do resíduo sólido foi possível utilizando os fungos, entretanto, a toxicidade aumentou, mostrando que a degradação deve ser estimulada por mais tempo ou é necessário o uso de outros organismos ou outras metodologias. A quantidade de enzimas lacase e manganês peroxidase produzida variou na presença do efluente ou do lodo. O tratamento anaeróbio/aeróbio mostrou-se o mais eficiente para a degradação do efluente, sendo a cor removida durante o processo anaeróbio e a toxicidade reduzida após o tratamento aeróbio.

Palavras-chave: biodegradação, efluente têxtil, lodo, resíduos sólidos, bioensaios, *Hydra attenuata*, *Lactuca sativa*, *Selenastrum capricornutum*.

ABSTRACT

Textile effluent toxicity after treatment by microorganisms

The Municipal Treatment Station of Americana, São Paulo, Brazil, manages 400 L s⁻¹ of effluent, from domestic and textile origin, which produces an average of 20 t of sludge per day. The degradation of the effluent and sludge by cyanobacteria, by fungus *Pleurotus*, and anaerobic system was evaluated after an activated sludge treatment. The detoxification was appraised with three bioassays comprising the cnidarian *Hydra attenuata*, the alga *Selenastrum capricornutum* and lettuce seeds. All the microorganisms were able to degrade and detoxify the effluent. The strains of *Pleurotus* were able to decolorized the sludge, however the toxicity increased. The three strains produced high amounts of manganese-peroxidase and laccase in the presence of the effluent or sludge. The anaerobic/aerobic treatment was the most efficient for degradation of the effluent and reducing its toxicity.

Key words: biodegradation, textile effluent, sludge, dye, decolorization, bioassay, *Hydra attenuata*, *Lactuca sativa*, *Selenastrum capricornutum*.

INTRODUÇÃO

As indústrias têxteis geram grande quantidade de resíduos com baixos níveis de degradação, incluindo os corantes utilizados no processo, conseqüentemente, há dificuldade de tratamento e disposição final desses resíduos. Cerca de 15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são perdidos no efluente. A degradação por microrganismos tem tido sucesso em alguns casos, porém, a baixa degradabilidade desses compostos tem resultado em níveis de degradação não satisfatórios, inclusive

em sistemas de lodo ativado. Nesses sistemas, grande quantidade de resíduo sólido é formada, contendo ainda grande parte dos corantes adsorvidos que são descartados em aterros industriais, sendo este outro problema ambiental.

O objetivo deste trabalho foi estudar a degradação por vários microrganismos em termos de descoloração e toxicidade, buscando uma tecnologia mais eficiente na degradação dos resíduos de efluente da Estação de Tratamento de Esgoto Municipal de Americana, SP, que contém efluentes de indústrias têxteis.

*Corresponding author: Regina T. R. Monteiro, e-mail: monteiro@cena.usp.br.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados o efluente e resíduo sólido da Estação de Tratamento de Esgoto de Americana (ETE-DAE/Americana, SP), os quais são resultantes do tratamento do efluente municipal por lodo ativado e contêm mistura de ¼ de esgoto doméstico e ¾ oriundos de 43 indústrias têxteis diferentes, sendo os corantes pertencentes à classe das antraquinonas e indigóides.

Os microrganismos foram os fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus*, duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 (F2) e PSC 94/03 (F6) e as cianobactérias *Anabaena flos-aquae*, *Phormidium autumnale* e *Synechococcus* sp. PCC. A degradação do efluente em meio anaeróbico e anaeróbico + aeróbico também foi estudada.

O inóculo fúngico foi preparado em meio malte-ágar (2% malte e 0,2% extrato de levedura) incubado a 28°C durante oito dias. Frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 3,5 g de bagaço de cana e 1,5 g de farelo de trigo foram inoculados com três discos de 5 mm de diâmetro da cultura. Após 12 dias de incubação, metade dos frascos foi inativada em estufa a 55°C, com a finalidade de verificar se a descoloração seria devido à adsorção ao micélio ou à degradação. Em seguida, 30 ml de efluente foram aplicados sobre os fungos ativos e inativos. Os frascos foram então incubados por duas semanas e analisados. As cianobactérias foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de efluente. Para o tratamento anaeróbico frascos de 150 ml, totalmente preenchidos, foram fechados com tampa de borracha e selados com fita de alumínio em atmosfera de CO₂ e incubados por 15 dias. Posteriormente, os frascos foram abertos para aeração e incubados por mais 15 dias.

O lodo residual misturado a bagaço de cana (5:1, v/v) foi inoculado com as três linhagens de *Pleurotus*. Após 30 dias foram analisados e a atividade das enzimas ligninolíticas manganês peroxidase e lacase foram medidas segundo metodologia de Kuwahara *et al.* (1984) e Szklarz *et al.* (1989).

A toxicidade do efluente foi avaliada utilizando como bioindicadores os organismos *Hydra attenuata*, a alga *Selenastrum capricornutum* e sementes de alface (*Lactuca sativa*).

Hydra attenuata: As amostras foram preparadas adicionando-se 14,7 mg de CaCl₂.2H₂O e 11 mg de tampão TES para 100 ml de amostra e ajustando-se o pH para 7,0 ± 0,1. As amostras foram filtradas a 0,22 µm para evitar crescimento microbiano e diluídas para 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; e 1,56% em meio para *Hydra* (Trottier *et al.*, 1997) e somente meio para controle. Quando não permitiram filtração, as amostras foram diluídas para a filtração. Foram utilizadas placas de poliestireno contendo 12 “pocinhos” (3 repetições × 4 concentrações) onde foram colocados 4 ml de amostra e 3 organismos por repetição. As alterações na morfologia (doses subletais) e morte das *Hydras* são avaliadas após 24, 48, 72

e 96 h de exposição, e os valores de NOEC (maior concentração sem efeito sobre o organismo) e LOEC (menor concentração que apresentou efeito sobre o organismo) foram calculados.

Selenastrum capricornutum: Foram utilizados 5 controles e 3 repetições das diluições 100; 50; 25; 12,5; e 6,25% da amostra filtrada a 0,22 µm em 2,5 ml de meio (Blaise *et al.*, 2000). Quando não foi possível a filtração a 0,22 µm do efluente, foram utilizadas diluições maiores. Prepararam-se 20 ml de uma solução de inóculo contendo 2,6.10⁵ cel./ml de maneira que fossem adicionadas 10.000 células para cada repetição. As amostras foram incubadas por 72 h a 24°C sob constante iluminação (4000 ± 10% lux). Foram feitas contagens do número final de algas e os valores da LC₅₀, que é a concentração que apresenta efeito sobre 50% dos indivíduos analisados, foram determinados.

Alface (*Lactuca sativa*): São colocadas 20 sementes de alface sobre papel de filtro Whatman n.1 em placa de poliestireno (Ø = 9 cm) embebida em 2 ml de cada diluição da amostra (100; 50; 25; 12,5; e 6,25%) filtrada em membrana Millipore 0,22 µm. As amostras são incubadas envoltas por papel de alumínio e após 72 h avaliam-se a germinação das sementes e o comprimento das radículas para o cálculo da LC₅₀ (Dutka, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cianobactérias *Anabaena*, *Phormidium* e *Synechococcus* foram capazes de descolorir o efluente, 24, 28 e 2%, respectivamente. Considerando que houve um efeito da cor verde das culturas, nas leituras, a descoloração foi maior do que a determinada pela metodologia empregada. Esse efeito foi mais pronunciado para a cianobactéria *Synechococcus*. A descoloração em meio anaeróbico e anaeróbico + aeróbico foi total. Isso indica a presença no efluente de organismos capazes de reduzir anaerobicamente as moléculas, com quebra do grupo cromóforo.

O tratamento do efluente com as cianobactérias foi capaz de reduzir a toxicidade em relação ao efluente-controle, para *H. attenuata* (Tabela 1). O controle incubado no escuro apresentou efeito tóxico ligeiramente maior que o controle na luz, indicando que a fotodegradação, embora pouco significativa, foi suficiente para reduzir a toxicidade. Foi encontrada inibição para o crescimento das radículas de alface somente para o controle escuro. No teste com alga não foi encontrada toxicidade.

As amostras de efluente tratadas com *Pleurotus* mostraram aumento nos valores de NOEC e LOEC para *H. attenuata*, indicando redução na toxicidade após o tratamento (Tabela 1). As linhagens inativadas mostraram menor redução no efeito tóxico, indicando adsorção dos corantes ao micélio, porém este não é o principal processo envolvido. No teste de germinação de sementes houve redução na toxicidade sobre o crescimento das radículas para as linhagens ativas de *Pleurotus*, mas não

para as inativadas. No teste com alga não foi detectada toxicidade em nenhum dos tratamentos.

Em meio anaeróbio, no teste com *H. attenuata* não foram detectadas diferenças na toxicidade antes e após o tratamento, mostrando que, embora não tenha havido redução na toxicidade, a degradação do efluente não resultou em formação de metabólitos mais tóxicos que a molécula original. Quando, após o tratamento anaeróbio, os frascos foram reaerados houve redução na toxicidade com relação ao controle (Tabela 1). A mesma tendência foi verificada no teste com a alga *S. capricornutum*, em que foram obtidos valores parecidos para a IC_{50} para o controle e tratamento anaeróbio, 73 e 70%, respectivamente, enquanto para o tratamento anaeróbio + aeróbio a toxicidade foi bastante reduzida. No teste de sementes não foi detectada toxicidade.

Descoloração e toxicidade do lodo por *Pleurotus*

As linhagens de *P. sajor-caju* F2 e F6 foram mais eficientes para descolorir o lodo do que *P. ostreatus*, após 30 dias de incubação. Houve aumento de toxicidade após o tratamento do lodo com as linhagens de *Pleurotus* sobre o organismo *H. attenuata*. A linhagem *P. sajor-caju* F6 foi o tratamento que

apresentou maior toxicidade. O lodo pode conter maior quantidade de corantes hidrofóbicos e insolúveis que são removidos do efluente, durante a decantação, de difícil degradação.

No teste com a alga *S. capricornutum* houve inibição somente na concentração de 100% do efluente, que foi de 32% para o controle, 40% para *P. sajor-caju* F6 e 11% para *P. ostreatus*. Para *P. sajor-caju* F2 não foi detectada inibição em nenhuma concentração. O teste de germinação e crescimento das radículas de alface mostrou redução na IC_{50} para todos os tratamentos com relação ao controle, $IC_{50} = 97$, o que significa aumento na toxicidade, IC_{50} para F2 = 41 e IC_{50} para F6 = 88.

A atividade enzimática foi maior na presença do lodo comparada com a do efluente (Tabela 2), entretanto, não teve correlação com a descoloração do lodo pelas linhagens. *P. sajor-caju* F2 foi o mais eficiente na descoloração do lodo e produziu manganês peroxidase em quantidade similar à de lacase (ao redor de 2,6 U), enquanto *P. ostreatus*, embora tenha sido menos eficiente na descoloração, produziu elevada quantidade de lacase (8,0 U) e manganês peroxidase (3,7 U), indicando que a presença de enzimas pode não ser o único fator envolvido na descoloração.

Tabela 1 — Valores de NOEC e LOEC para *Hydra* e IC_{50} para *L. sativa* para o efluente tratado com linhagens de cianobactérias, *Pleurotus* e sistema aeróbio/anaeróbio.

Tratamentos	<i>Hydra</i>		Sementes
	NOEC	LOEC	IC_{50}
Controle escuro	6,25	12,5	94,98
Controle luz	12,5	25	0
<i>Anabaena</i>	25	50	0
<i>Phormidium</i>	50	—	0
<i>Synechococcus</i>	25	50	0
Controle	1,56	3,125	53,69
<i>P. sajor-caju</i> F2 ativo	12,5	25	0
<i>P. sajor-caju</i> F2 inativo	6,25	12,5	52,13
<i>P. sajor-caju</i> F6 ativo	12,5	25	0
<i>P. sajor-caju</i> F6 inativo	6,25	12,5	66,35
<i>P. ostreatus</i> ativo	12,5	25	0
<i>P. ostreatus</i> inativo	3,125	6,25	62,73
Controle	12,5	25	73,35
Anaeróbio	12,5	25	70,39
Aeróbio + anaeróbio	50	100	0

Tabela 2 — Atividade das enzimas manganês peroxidase e lacase dos fungos na presença do efluente e lodo.

Tratamentos	Efluente		Lodo	
	Manganês peroxidase	Lacase	Manganês peroxidase	Lacase
Controle	0	0	0	0
<i>P. sajor-caju</i> F2	0,31196	0,5239	2,3617	0,293
<i>P. sajor-caju</i> F6	0,39572	2,2427	2,7653	2,555
<i>P. ostreatus</i>	0,75384	0,0264	3,7219	8,008

CONCLUSÃO

Os estudos mostraram que os organismos foram eficientes no tratamento do efluente quanto à descoloração e toxicidade. O lodo descoloriu, entretanto apresentou aumento na toxicidade após o tratamento, indicando a necessidade de combinação com outros tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. B., 1968, Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.*, 4: 1-4.
- ALLEN, M. M. & ARNON, D. I., 1955, Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I – Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiology*, 30: 366-372.
- BLAISE, C., FORGET, G. & TROTTIER, S., 2000, Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-H exposure *Selenastrum capricornutum* assay. *Technical Methods*, 15(4): 352-359.
- DIELS, L., 1997, Heavy metal bioremediation of soil. In: Sheehan, D. *Bioremediation protocols*. Ed. Humana Press, v. 2, 339p.
- DUTKA, B., 1989, *Short-term root elongation toxicity bioassay*. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada.
- KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A. & GOLD, M. H., 1984, Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letter*, 169: 247-250.
- SZKLARZ, G., ANTIBUS, R. K., SINSABAUGH, R. L. & LINKINS, A. E., 1989, Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, 81: 234-240.
- TROTTIER, S., BLAISE, C., KUSIN, T. & JOHNSON, E. M., 1997, Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Technical Methods*, pp. 265-271.



SETAC – Brazil

Utilização de Planárias da Espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* em Testes de Toxicidade de Efluente de Refinaria de Petróleo

G. S. BARROS,^{1*} D. F. ANGELIS,¹ L. T. FURLAN² & B. CORRÊA-JUNIOR²

¹Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP

²PETROBRAS, Refinaria de Paulínia, Paulínia, SP

RESUMO

A ação do efluente da Refinaria Petróleo de Paulínia (REPLAN) foi testada em planárias de água doce da espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* em estado de regeneração. Este teste de toxicidade crônica foi realizado com o intuito de estabelecer condições para utilizá-las no monitoramento da eficácia do tratamento aplicado pela refinaria. Foram testadas as amostras coletadas de seis pontos: rio Jaguari (captação da REPLAN); entrada de tratamento biológico (após tratamento físico); entrada da Lagoa de Estabilização (última etapa do tratamento); saída da Lagoa de Estabilização; montante à descarga de efluente no rio Atibaia; e jusante à descarga de efluente. Água mineral foi utilizada como controle. Cinco ou oito planárias adultas em regeneração para cada ponto foram testadas. Espécimes adultos foram selecionados e não foram alimentados durante o experimento. O teste foi iniciado imediatamente após a remoção das cabeças das planárias (corte com lâmina) e finalizado quando a regeneração estava completa. Detectou-se efeito altamente tóxico apenas para os indivíduos testados na amostra referente ao término do tratamento primário, antes da aeração e do tratamento biológico aplicado pela refinaria. Pode-se concluir que o efluente da REPLAN, ao final do processo de tratamento, não ocasionou nenhum efeito na regeneração cefálica.

Palavras-chave: toxicidade crônica, planárias, efluente de petróleo, água, *Dugesia (Girardia) tigrina*.

ABSTRACT

Use of freshwater planarians *Dugesia (Girardia) tigrina* testing toxicity of a petroleum refinery wastewater

The action of wastewater from Paulínia Petroleum Refinery (REPLAN) was tested in freshwater planarian regeneration, from the species *Dugesia (Girardia) tigrina*. This chronic toxicity test was realized to establish conditions to use them as a monitoring species of the refinery treatment efficiency. The tested samples were collected at six points: rio Jaguari (REPLAN water intake); wastewater beginning biological treatment (after physical treatment); wastewater entering stabilization lagoon (last stage of treatment); discharge of stabilization lagoon; upstream from effluent discharge at rio Atibaia; downstream from the effluent discharge. Drinking water was used as control. Five or eight adult planarian at regeneration stage was tested in each point. The adult tested specimens were selected and weren't feed during the experiment. The test was initiated immediately after the removal of planarian's head (cut with blade) and finalized when the regeneration was complete. It was detected high toxic effect only at the sample from the primary treatment discharge, before realizing the aeration and biological treatment. We can conclude that REPLAN effluent, at the end of the treatment process don't cause any effect in *Dugesia (Girardia) tigrina* cephalic regeneration.

Key word: chronic toxicity, freshwater planarians, petroleum's effluent, water, *Dugesia (Girardia) tigrina*.

*Corresponding author: Gislaíne Silva Barros, e-mail: gsbarros@gmail.com.

INTRODUÇÃO

O meio aquático há muito tempo tem sido utilizado para lançamento de efluentes, tanto industriais como domésticos. Atualmente, para o monitoramento da qualidade dos corpos hídricos, análises químicas e físicas são consideradas insuficientes para prever a possível toxicidade. O uso de bioindicadores permite a comprovação de que determinado composto ou suas misturas exerçam algum efeito. As refinarias utilizam grande volume de água nos processos de refino. Cada etapa do processo de refino pode acrescentar ao efluente final complexas misturas de substâncias químicas. Esta pesquisa é parte de um convênio da Refinaria de Petróleo de Paulínia (REPLAN) e FUNDUNESP, que analisa diferentes partes do tratamento do efluente da refinaria e sua influência no rio Atibaia, antes e após o lançamento. São avaliados seus principais parâmetros: físicos, químicos e biológicos e toxicológicos.

O monitoramento permite que a empresa obtenha controle ambiental atualizado, capaz de sinalizar com antecedência os ajustes industriais, quando necessários; estabelece condições para que possam capitalizar os aspectos positivos do monitoramento diante da opinião pública, órgãos de governo, imprensa e mercados de atuação; possibilita se adequar às normas ISO 14000; bem como proporciona condições para que a empresa possa se adaptar às exigências da legislação ambiental, segundo o Ministério do Meio Ambiente.

Os comitês internacionais de regulamentação na área de toxicologia genética recomendam a aplicação de mais de uma centena de testes para a determinação dos potenciais mutagênicos, carcinogênicos e genotóxicos.

Os testes de toxicidade buscam detectar efeito subletal em planária sob condições de regeneração. Planárias são importantes componentes de ecossistemas límnicos, têm ampla distribuição geográfica, são sensíveis a poluentes e possuem alta capacidade de regeneração, além de fácil criação e manutenção em laboratório.

Graças a sua hierarquia relativamente simples de organização, os invertebrados representam um modelo apropriado para investigação funcional da interação neural em animais simples. A este respeito, a planária, um verme chato considerado ancestral de todo Bilateria, incluindo Chordata, é de particular relevância por ser o maior exemplo primitivo de centralização do sistema nervoso (Caronti *et al.*, 1999).

Planárias de água doce têm sido estudadas para avaliar os efeitos biológicos de poluentes em testes de toxicidade de curto prazo. Esses organismos são particularmente utilizados no campo da toxicologia aquática, porque são sensíveis a uma variedade de agentes farmacológicos e toxicológicos, indicando que podem ser feitas analogias bioquímicas e fisiológicas com a suscetibilidade de animais superiores aos poluentes. E mais, o alto poder de regeneração faz deles um apropriado sistema para testar o efeito teratogênico em organismos adultos (Calevro *et al.*, 1998).

Por serem saprófagas, as planárias têm função muito importante nos ecossistemas aquáticos. Nenhuma espécie de saprófaga sozinha consegue decompor completamente um cadáver. Contudo, as comunidades de decompositores existentes na biosfera consistem em muitas espécies que, pela sua ação seqüencial, conseguem decompô-lo completamente. A decomposição ocorre através de transformações de energia dentro de e entre os organismos, sendo uma função absolutamente vital. Se não ocorresse, todos os nutrientes ficariam retidos em cadáveres e nenhuma vida nova poderia ser produzida (Odum, 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e regime de manutenção

Os espécimes utilizados pertencem à população de *Dugesia (Girardia) tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) identificada pela Dra. Eudóxia M. Froehlich (USP – São Paulo, SP). As planárias foram coletadas no tanque de criação de plantas e invertebrados para aulas práticas, do Jardim Experimental no Instituto de Biociências da Unesp, Campus de Rio Claro, e transportadas para aquários no laboratório de toxicidade, onde os animais são mantidos em aquários com água potável (mineral) e alimentados semanalmente com fígado bovino fresco. O alimento é colocado no aquário para que se alimentem e após doze horas é retirado; em seguida é realizada a limpeza dos aquários. Os casulos são separados e mantidos em recipientes separados até a eclosão. São mantidos nos aquários separados pelo mês de eclosão.

Amostras testadas

Foram testadas as amostras coletadas de seis pontos: rio Jaguari (captação da REPLAN para uso social e industrial); entrada no tratamento biológico (efluente bruto com remoção física de óleos e graxas); entrada da Lagoa de Estabilização (efluente tratado); saída da Lagoa de Estabilização; montante à descarga de efluente no rio Atibaia; e jusante à descarga de efluente.

Tratamento experimental

Ao todo foram realizados cinco testes, nas seguintes datas: 15 de dezembro de 2003, 5 de maio de 2004, 16 de junho de 2004, 14 de julho de 2004 e 1 de setembro de 2004.

Para os ensaios biológicos de toxicidade empregando as planárias foram utilizados: vermes de mesmo comprimento, nascidos no mesmo mês, tendo em média 15 mm, visível abertura do gonóporo e postura de casulo na população em que estavam inseridos. De acordo com a metodologia empregada por Calevro *et al.* (1998), são transferidas para placas de petri com água e no movimento de alongação são cortadas com uma lâmina na altura abaixo das aurículas. A seguir as partes posteriores dos animais são transferidas para as placas do ensaio (controle e amostras).

Durante o ensaio, os animais são mantidos sob iluminação natural, temperatura constante de 22°C e não são alimentados. As observações são feitas a cada 24 horas. Após nove ou dez dias, o ensaio é finalizado. O teste limitou-se a observar a regeneração e a locomoção; a mudança de comportamento (imobilidade) é um parâmetro de fácil medição diária, mostrando efeito subletal.

Em cada placa do ensaio foram testadas cinco ou oito planárias (cinco no primeiro experimento e oito nos demais) em 75 ml de solução-problema, observando uma densidade de 0,094 indivíduos/ml. A densidade ideal de manutenção das planárias é de 0,04 indivíduo por mililitro, ou seja, dez planárias para cada 250 ml de água, segundo estudos comportamentais realizados por Reynoldson *et al.* (1965), mas isso não foi seguido devido à necessidade de um número mínimo de planárias para o teste, tendo, assim, que submetê-las a um ambiente estressante durante o experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos cinco experimentos realizados, no ponto referente ao efluente bruto observou-se a mortalidade de todos os indivíduos no primeiro dia do teste, o qual foi realizado sem diluição (Tabela 1). Também não houve em nenhuma das planárias sobreviventes mudanças na locomoção que possam ser consideradas significativas. Foram realizados cinco testes, nos quais foi observado certo padrão: ao final de nove dias o teste estava finalizado, no entanto, ainda foi observado por mais um dia, totalizando 240 horas de observação. Todos os pontos, com exceção do ponto 6, tiveram regeneração similar à do controle: com 48 horas houve a formação do blastema, com sua constituição/crescimento normal até 120 horas; com 144 horas de experimento houve a formação inicial do ocelo, com sua formação completa em 192 horas; com 144 horas observou-se o início da formação das aurículas e finalização em 216 horas. Pôde-se, assim, considerar a regeneração completa. A densidade variou entre 0,7 e 0,11 indivíduo/mililitro, com a média de 0,094, o que não parece ter afetado as populações em teste.

Não houve diferença detectável em quase todas as amostras, tanto na regeneração quanto na diminuição ou modificação da locomoção dos animais observados. Apenas em um dos testes realizado houve alteração: um indivíduo de apenas duas amostras e em um experimento não se regenerou; somente o blastema foi formado até o décimo dia de observação. No entanto, não podemos inferir se foi algum componente do efluente que causou a diferença, pois parece ser um caso isolado, e isso ocorreu tanto no ponto de captação de água no rio Jaguari, que não sofre interferência do efluente da Refinaria, quanto no ponto do lançamento do efluente no rio Atibaia.

O presente trabalho sugere que planárias da espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* constituem os organismos que podem ser utilizados para testes de toxicidade de corpos d'água que sofrem influência de efluentes de refinaria de petróleo para a verificação da eficácia do tratamento aplicado. Especificamente para as amostras dos rios Jaguari, Atibaia e efluente tratado da REPLAN, as planárias não detectaram toxicidade para o mecanismo de regeneração.

Agradecimentos — Agradecimentos à Dra. Eudóxia M. Froehlich (USP), que identificou a espécie em estudo e forneceu gentilmente o material e conhecimento que possuía sobre esta; a Gisela de Aragão Umbuzeiro (CETESB), pelas críticas e pelo incentivo; e a Valdenilson José Alves de Oliveira (Unesp, Rio Claro, SP), pela coleta do material e auxílio na manutenção das planárias. Esta pesquisa foi financiada por um convênio entre FUNDUNESP X REPLAN/PETROBRAS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALEVRO, F., FILIPI, C., DERI, P., ALBERTOSI, C. & BATISTONE, R., 1998, Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere*, 37(4): 651-659.
- CARONTI, B., MARGOTTA, V., MERANTE, A., PONTIERI, F. E. & PALLADINI, G., 1999, Treatment with 6-hidroxydopamine in planaria (*Dugesia gonocephala s.l.*): morphological and behavioral study. *Comp. Bioch. and Phys, Part C*, 123: 201-207.
- ODUM, E. P., 2001, *Fundamentos de ecologia*. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 6ª ed., 927p.
- REYNOLDSON, T. B., YOUNG, J. O. & TAYLOR, M. C., 1965, The effect of temperature on the life-cycle of four species of lake-dwelling triclads. *Journal of Animal Ecology*, Oxford, 34(1): 23-43.

ANEXO 1

Tabela 1 — Média porcentual dos testes de toxicidade crônica em *Dugesia (Girardia) tigrina* no que se refere à mortalidade, motilidade e regeneração com cinco amostras coletadas em diferentes pontos do município de Paulínia, SP.

Amostra	Fase	Controle		Rio Jaguari		Entrada Lagoa de Estabilização		Saída Lagoa de Estabilização		Montante rio Atibaia		Juzante rio Atibaia		Entrada tratamento	
		Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração
T ₀	A	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{24h}	A	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{48h}	B	0	95	0	100	0	100	0	100	0	95	0	97	0	97
T _{72h}	B'	0	97	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{96h}	C	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{120h}	C	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{144h}	C'D	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{168h}	C'D	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{192h}	C'D	0	100	0	100	0	100	0	97	0	100	0	100	0	100
T _{216h}	C'D'	0	100	0	97	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{240h}	C'D'	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T (°C)		22		22		22		22		22		22		22	
Dens. (Ind./ml)		0,094		0,094		0,094		0,094		0,094		0,094		0,094	

A – corpos acéfalos; B – formação de blastema; B' – constituição normal do blastema; C – início da formação de ocelo; C' – formação completa dos ocelos; D – início da formação das aurículas; D' – formação completa das aurículas.



SETAC – Brazil

Influência do Fenarimol no Desenvolvimento Animal e Reprodução em Ratos

V. CASTRO,^{1*} S. SCRAMIN¹ & M. MELO²

¹Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Ecotoxicologia, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

RESUMO

A busca de indicadores de efeitos devido à exposição de organismos não-alvo a fungicidas vem se intensificando. Atualmente, as alterações bioquímicas e as relacionadas a parâmetros do desenvolvimento estão entre as medidas de eventos mais estudados como possíveis indicadores na dependência da ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento, já que muitos desses produtos alteram vários aspectos do sistema reprodutivo. Aos indicadores usados tradicionalmente como porcentagem de fertilidade, abortos e natimortos, foram acrescentados outros parâmetros relativos ao desenvolvimento físico reprodutivo (dia médio de descida do testículo e abertura de vagina), além do estabelecimento de método *in vitro* para avaliação da possível interferência dos pesticidas na atividade da CYP19 aromatase, que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos. Neste trabalho procurou-se avaliar os possíveis efeitos do fungicida Fenarimol após exposição perinatal, uma vez que o transporte placentário do Fenarimol aumenta a partir do 18º dia da prenhez e é excretado pelo leite materno. As fêmeas de ratos Wistar foram expostas a 150 ou 300 mg.kg⁻¹ de Fenarimol (S.C.) durante o período inicial ou final da prenhez ou durante os seis primeiros dias da lactação. As taxas de viabilidade ao nascimento (VA) e ao desmame (VD) foram observadas conforme: VA = 100 × (número de filhotes natimortos/nascidos vivos) e VD = 100 × (número de filhotes desmamados/nascidos vivos). Todos os filhotes tiveram seu desenvolvimento físico reprodutivo acompanhado até o 26º dia de vida. As duas doses estudadas, apesar de terem afetado de forma pontual os parâmetros físicos observados, não demonstraram clara evidência de efeito dose-resposta ao Fenarimol dentro da mesma fase (prenhez e lactação). Tais observações enfatizam a importância de estudos prospectivos desses produtos, com o uso de indicadores que evidenciem alterações sutis. A obtenção de dados de alvos mais sensíveis poderá contribuir para o aprimoramento dos instrumentos com os quais os riscos possam ser minimizados em relação à saúde ambiental. Assim é que, para a avaliação da provável interferência do fungicida na atividade da aromatase, está sendo adaptado o método no qual são utilizados microssomos de fígado de ratos como fonte da enzima a ser avaliada em presença do Fenarimol.

Palavras-chave: Fenarimol, ratos, bioindicadores, desenvolvimento animal, reprodução.

ABSTRACT

Fenarimol effects on the animal development and rats reproduction

The search of biomarkers of effects due to the non-target organisms' exposure to fungicides comes intensifying itself. Nowadays the alterations of biochemical and of developmental parameters are among the measures of events most studied as possible biomarkers depending of the critical periods in the development; since many of these products alter several aspects of the reproductive system. Beyond the biomarker used traditionally as fertility percentage, abortions and still-born, were added other parameters related to the reproductive physical development (average day of testicle descent and vagina opening); and *in vitro* establishment of the method for evaluation of the possible pesticides interference in CYP19 aromatase activity, that catalyzes the conversion of androgens in estrogens. In this work, it was evaluate the possible effects of the fungicide Fenarimol after perinatal exposure, since the fenarimol placental transport increases from the 18th gestational day and is excreted via maternal milk. The females Wistar rats were exposed to 150 or 300 mg.kg⁻¹ of Fenarimol

*Corresponding author: Vera Castro, e-mail: castro@cnpma.embrapa.br.

(S.C.) during the initial or final gestational period or during the six first days of suckling. The birth (VA) and weaning (VD) viability were observed as: $VA = 100 \times (\text{number of stillborn/born alive})$ and $VD = 100 \times (\text{number of weaned/born alive})$. All pups had its reproductive physical development accompanied till the 26th life day. Both studied doses, in spite of having affected the observed physical parameters in a punctual way, did not cause clear evidence of a dose-response effect to Fenarimol within the same phase (gestation and lactation). Such observations emphasize the importance of these products prospective studies, with the biomarkers use that may evidence subtle alterations. The obtained data of more sensitive targets will be able to contribute for the amelioration of the methods and polices that are able to minimize the risks regarding the environmental health. Thus, it is being adapted the method for the evaluation of possible fungicide interference in aromatase activity, in which are used mice liver microsomes as enzyme source to be evaluated at the presence of Fenarimol.

Key words: Fenarimol, rats, biomarkers, animal development, reproduction.

INTRODUÇÃO

O rápido crescimento da utilização de produtos químicos introduziu o conceito de análise de risco dentro da avaliação de impacto ambiental. O risco refere-se à probabilidade de um organismo ou uma determinada população sofrer dano. Esta avaliação é realizada, quanto à saúde ambiental, identificando órgãos ou sistemas afetados que podem levar a enfermidades e desequilíbrios e estabelecendo as condições de exposição e dose ao agroquímico que levam ao dano e/ou enfermidade. Os agroquímicos podem ocasionar prejuízos ao desenvolvimento embrionário, provocando aborto ou deficiências na formação do feto (Nurminen, 1995). O estudo do efeito desses produtos durante a fase de lactação também é importante devido à possibilidade de sua eliminação por esta via e, conseqüentemente, de expor o filhote ao mesmo. Essa exposição pode levar a alterações fisiológicas e comportamentais, uma vez que ao nascer os animais não possuem todos os sistemas fisiológicos maduros (Thiel *et al.*, 1994; Hällén *et al.*, 1995; Vogel & Hagler, 1996; Pohl *et al.*, 1998).

Para ajudar a determinar os riscos através da exposição a substâncias químicas em humanos a USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) vem requerendo freqüentemente tipos específicos de testes toxicológicos, usualmente em ratos e camundongos. Muitos agentes ambientais (entre eles os pesticidas) afetam o sistema reprodutivo, e os testes confirmam informações de seus efeitos sobre vários aspectos deste, incluindo gestação, parto, lactação, desmame, crescimento e desenvolvimento da prole (Claudio *et al.*, 1999). A exposição a agroquímicos pode ocasionar alterações na modulação do sistema endócrino de animais silvestres e do ser humano, que resultariam em efeitos prejudiciais reprodutivos e na indução de certos tipos de câncer. Um dos possíveis mecanismos de ação para esse efeito é a interferência com a síntese de esteróides, mais precisamente com a enzima CYP19 aromatase, que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos, sendo responsável pelo balanço homeostático entre o que tradicionalmente são considerados hormônios femininos e masculinos. Em vertebrados, a aromatase está presente no cérebro, e o *imprinting* perinatal é governado por hormônios esteróides no cérebro, em desenvolvimento.

Em alguns estudos foi observado que o transporte placentário de Fenarimol ocorre ao redor de 0,1% da dose administrada, correspondente a 350 mg.kg^{-1} na ração do dia 0 aos dias 14, 15, 16, 17 ou 18 quando o [¹⁴C] Fenarimol (8,2 μCi) foi administrado em dose única, embora a partir do 18^o dia da prenhez sua taxa de concentração seja 1,0. A sua concentração no leite materno alcança concentrações 3 a 5 vezes aquelas encontradas no plasma materno. Após a administração de [¹⁴C] em ratas no quinto dia de lactação, aparecem altas concentrações de radioatividade no hipotálamo dos neonatos, que aumentam rapidamente e decrescem mais lentamente. Essas altas concentrações do fungicida coincidem com a época do desenvolvimento do comportamento sexual (Hirsch *et al.*, 1986).

Tais observações, em relação ao desenvolvimento e/ou expressão do sistema reprodutor masculino, enfatizam a importância do estudo prospectivo dos efeitos desse fungicida. Assim, a avaliação perinatal é importante para o desenvolvimento do estudo do desenvolvimento animal e da teratologia (Nelson, 1991).

O objetivo do trabalho foi avaliar alguns parâmetros reprodutivos em ratas expostas ao Fenarimol e avaliar alguns possíveis efeitos no desenvolvimento físico de ratos expostos perinatalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados e exposição ao Fenarimol

Os animais utilizados foram ratos Wistar, mantidos em condições padronizadas de biotério. Para o acasalamento, cada macho foi colocado com duas fêmeas de ciclo estral regular. A presença de espermatozoides no lavado vaginal das ratas foi considerada como indicativa do 1^o dia de prenhez. Foi anotado o ganho de peso de cada fêmea durante a prenhez e dos filhotes do 1^o até o 23^o dia de vida. As fêmeas foram expostas durante o início (1-6 dias; Pri) ou o final da prenhez (15-21 dias, Prf) ou os seis primeiros dias da lactação (Lac), por via subcutânea, nas doses fracionadas de princípio ativo de 150 ou 300 $\text{mg.kg}^{-1}/\text{d}$ de Fenarimol, Rubigan®, Dow AgroSciences.

Número de animais utilizados

Foram usadas 10 fêmeas para cada grupo experimental. Na análise do desenvolvimento físico foram utilizados todos os filhotes de cada ninhada.

Parâmetros analisados

Foram avaliadas as taxas de viabilidade ao nascimento e ao desmame das proles conforme descrito: VA = $100 \times$ (número de filhotes natimortos/nascidos vivos) e VD = $100 \times$ (número de filhotes desmamados/nascidos vivos). Os filhotes foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento físico. A presença ou ausência dos parâmetros observados deu-se de acordo com a idade do filhote e por determinado número de dias consecutivos até o aparecimento do mesmo em todos os filhotes avaliados (Alder, 1983; Hossain *et al.*, 1999). Foram anotados, por filhote, os dias respectivos em que ocorreram a abertura de vagina (20 a 26 dias de vida) e a descida dos testículos (20 a 26 dias de vida).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de viabilidade ao nascimento e ao desmame das proles das fêmeas expostas ao Fenarimol ou não (controle) estão descritas na Tabela 1. Os resultados desta avaliação quanto ao potencial de toxicidade do fungicida são registrados em porcentagem.

A taxa ao nascimento foi calculada para verificar a possibilidade de efeitos observados nos testes devido a problemas na prenhez das ratas. Verificamos, dos resultados obtidos, que há efeito do fungicida na curva de sobrevivência dos filhotes. Quantidades distintas de Fenarimol não interferem na curva de sobrevivência dos filhotes, ou seja, o número de ratos vivos cujas ninhadas foram expostas na mesma fase, porém submetidas a doses distintas de Fenarimol, é estatisticamente similar. Períodos distintos de exposição interferem na curva de sobrevivência dos filhotes,

ou seja, o número de ratos vivos cujas ninhadas foram tratadas com uma mesma dose, porém em fases distintas, é estatisticamente diferente. Os dados presentes são uma confirmação da sensibilidade dos animais no período perinatal a este fungicida, que pode ser excretado no leite (Hirsch *et al.*, 1986).

Na Tabela 2 estão descritos os resultados obtidos dos parâmetros de desenvolvimento físico dos filhotes, abertura de vagina e descida dos testículos, sendo estes parâmetros observados em todos os filhotes das ninhadas. São apresentados os dias médios e respectivos desvios-padrão para que 100% dos filhotes de cada ninhada ($n = 10$) pertencentes a um mesmo grupo apresentem o parâmetro estudado.

Apesar da diversidade de estudos existentes, o impacto dos pesticidas na saúde nem sempre é bem conhecido. Sabe-se, por exemplo, que a exposição de fêmeas a pesticidas durante a fase reprodutiva pode levar a alterações fetais com reflexos físicos e comportamentais, na dependência da ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal, durante a prenhez e imediatamente após o nascimento.

O Fenarimol produz a inibição da atividade da aromatase CYP19, com conseqüente prejuízo da síntese de estradiol, concorrendo para falhas na diferenciação sexual cerebral de machos (Hirsch *et al.*, 1987; Vinggaard *et al.*, 2000). A aromatase citocromo P450 é produzida pelo gene CYP19. Um dos principais passos no desenvolvimento e diferenciação sexual no cérebro é a conversão intraneuronal de andrógenos em estrógenos. Esse passo é catalisado pela enzima denominada aromatase citocromo P450 (CYP19). Durante o desenvolvimento, a formação local de estrógeno em determinadas regiões cerebrais desempenha importante função no mecanismo através do qual os esteróides sexuais desempenham sua ação neuroendócrina central, influenciando a diferenciação cerebral, a regulação do controle gonadotrófico e o comportamento (Stoffel-Wagner, 1999; Honda *et al.*, 1998). Conseqüentemente, ele pode promover alterações neurocomportamentais e reprodutivas.

Tabela 1 — Avaliação da taxa de viabilidade ao nascimento e ao desmame em ratas ($n = 10$) expostas oralmente ao Fenarimol (150 ou 300 mg.kg⁻¹, S.C.). Os dados são apresentados em porcentagem (teste $\chi^2 - p < 0,05$; * = estatisticamente significativo). São apresentados também a média de dias de duração em dias da prenhez das fêmeas de cada grupo e seus respectivos desvios-padrão.

Grupos	Taxa de viabilidade ao nascimento (%)	Taxa de viabilidade ao desmame (%)	Duração da prenhez (dias)
ConPri	96,67 (3/90)	83,33 (75/90)	21,7 ± 0,95
ConPrf	100,0 (0/85)	97,64 (83/85)	21,7 ± 0,48
ConLac	97,19 (3/107)	85,04 (91/107)	22,0 ± 0,82
FenPri 150	100,0 (0/89)	77,52 (69/89)	22,0 ± 1,15
FenPri 300	98,95 (1/96)	79,16 (76/96)	21,7 ± 0,82
FenPrf 150	96,93 (3/98)	95,91 (94/98)*	21,6 ± 0,70
FenPrf 300	91,14 (7/79)	97,46 (74/79)*	22,0 ± 0,67
FenLac 150	100,0 (0/90)	77,77 (70/90)*	22,7 ± 0,67
FenLac 300	100,0 (0/89)	77,52 (69/89)*	22,3 ± 0,48

Tabela 2 — Desenvolvimento físico e neurocomportamental dos filhotes de fêmeas expostas a 150 ou 300 mg.kg⁻¹ de Fenarimol, S.C. São apresentados os dias médios e respectivos desvios-padrão para que 100% dos filhotes de cada ninhada (n = 10) pertencentes a um mesmo grupo apresentem o parâmetro estudado (teste t de Student – p < 0,05; * = estatisticamente significativo).

Grupos	Média de dias para apresentar a característica avaliada	
	Abertura de vagina	Descida de testículo
ConPri	17,0 ± 0,00	17,2 ± 1,25
ConPrf	17,6 ± 0,92	17,6 ± 0,91
ConLac	17,2 ± 0,98	16,7 ± 1,27
FenPri150	16,0 ± 0,00	16,6 ± 1,02
FenPri300	17,7 ± 0,90	17,5 ± 0,81
FenPrf150	18,6 ± 0,49	18,4 ± 0,49*
FenPrf300	18,0 ± 0,45	17,9 ± 0,70
FenLac150	16,6 ± 1,43	16,2 ± 1,99
FenLac300	17,8 ± 0,60	16,6 ± 1,43

Em relação aos dados obtidos dos parâmetros físicos de amadurecimento sexual, o Fenarimol causou atraso na descida dos testículos quando administrado no final da prenhez. Porém, os dados só apresentaram significância na menor dose. Apesar disso, esse achado indica que a exposição ao fungicida nessa fase do desenvolvimento pode ocasionar prejuízos reprodutivos em longo prazo. Estudos posteriores deverão ser realizados para esclarecer a falta de um efeito dose-resposta evidente. O conhecimento obtido através do uso de protocolos experimentais contendo índices relacionados ao desenvolvimento embriofetal poderá levar a melhores escolhas na prevenção do risco à saúde humana devido ao uso de agrotóxicos (Nurminen, 1995; Nelson, 1991).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDER, S., 1983, Behavioral teratology. In: Q. Zbinden, G. Racagni, V. E. Cuomo & B. Weiss. *Application of behavioral pharmacology in toxicology*. Raven Press, New York, pp. 57-66.
- CLAUDIO, L., BEARER, C. F. & WALLINGA, D., 1999, Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, part I: The reproduction and fertility testing guidelines. *American J. of Industrial Med.*, 35: 543-553.
- HALLÉN, I. P., JORHEM, L. & OSKARSSON, A., 1995, Placental and lactational transfer of lead in rats: a study on the lactational process and effects on offspring. *Arch. Toxicol.*, 69: 596-602.
- HIRSCH, K., ADAMS, E., HOFFMAN, D., MARKHAM, J. & OWEN, N., 1986, Studies to elucidate the mechanism of Fenarimol-induced infertility in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 86: 391-399.
- HIRSCH, K., WEAVER, D., BLACK, L., FALCONE, J. & MACLUSKY, N., 1987, Inhibition of central nervous system aromatase activity: a mechanism for Fenarimol-induced infertility in the male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 91: 235-245.
- HONDA, S., HARADA, N., ITO, S., TAKAGI, Y. & MAEDA, S., 1998, Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252: 445-449.
- HOSSAIN, M., DEVI, P. & BISHT, K., 1999, Effect of prenatal gamma irradiation during the late fetal period on the postnatal development of the mouse. *Teratology*, 59: 133-138.
- NELSON, B., 1991, Evidence for behavioral teratogenicity in humans. *J. Appl. Toxicol.* 11: 33-37.
- NURMINEN, T., 1995, Maternal pesticide exposure and pregnancy outcome. *J. Occupac. Medic.*, 37: 935-940.
- POHL, H., SMITH-SIMON, C. & HICKS, H., 1998, Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: developmental effects. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.*, 28: 55-60.
- STOFFEL-WAGNER, B., WATZKA, M., SCHRAMM, J., BIDLINGMAIER, F. & KLINGMULLER, D., 1999, Expression of cyp19 (aromatase) mRNA in different areas of the human brain. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 70: 237-241.
- THIEL, R., KOCK, E., ULBRICH, B. & CHAHOUD, I., 1994, Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo- p- dioxin: effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behavior in Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, 69: 79-86.
- VINGGAARD, A., HNIDA, C., BREINHOLT, V. & LARSEN, J., 2000, Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicology in Vitro*, 14: 227-234.
- VOGEL, G. & HAGLER, M., 1996, Effects of neonatally administered inpridole on adult behaviors of rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 55(1): 155-161.



Hydrothermal Vents as a Possible Natural Pollution Laboratory: Metal Detoxification Mechanisms in Mussels and Fishes from Lucky Strike

R. COMPANY,^{1*} A. SERAFIM,¹ H. FELÍCIA,¹ R. COSSON,² A. FIALA-MÉDIONI³ & M. J. BEBIANNO^{1*}

¹ CIMA, University of Algarve, FCMA, Campus de Gambelas, 8000-870 Faro, Portugal

² University of Nantes, Laboratory of Marine Biology, ISOMER, BP 92208, 44322 Nantes, France

³ University P.M. Curie, Observatoire Océanologique, BP 44, 66651 Banyuls sur Mer, France

ABSTRACT

Deep-sea hydrothermal vent environments are considered highly toxic with high temperatures, sulphide, methane, carbon dioxide and heavy metals. Paradoxically, life at the vents exhibits high productivity and therefore provides a unique way to study the effect of long-term adaptation to environmental stress. The aim of this study was to compare the responses of some biomarkers of metal exposure between two hydrothermal species, the mussel *Bathymodiolus azoricus* and the chimaera fish *Hydrolagus pallidus* from Lucky Strike vent field. Results show high metal levels in *B. azoricus* compared to their coastal counterparts, especially for Ag, Cd, Cu and Zn in the gills. However, metallothionein (MT) levels were surprisingly low taking into account the metal accumulation. *H. pallidus* also exhibited significantly higher metal concentrations in the gills than the muscle, however with MT levels 2-fold higher in the muscle. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in the mussels were significantly higher in the gills, while glutathione peroxidases (GPx) were present mainly in the mantle, suggesting the two tissues have different antioxidant responses to deal with stress factors. Lipid peroxidation (LPO) was more evident in the gills, indicating that defence mechanisms in this tissue may not be completely effective against metal toxicity. Although the major food source for *H. pallidus* consists in metal overloaded mussels, no evidences of metal bioamplification were found. Chimaeras may possess other detoxification mechanisms that can be more important than MT.

Key words: *Bathymodiolus azoricus*, *Hydrolagus pallidus*, metallothioneins, antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

RESUMO

Fontes hidrotermais como possíveis laboratórios naturais de poluição: mecanismos de detoxificação de metais em mexilhões e peixes de Lucky Strike

As fontes hidrotermais são consideradas ambientes extremamente tóxicos, caracterizadas por elevadas temperaturas e presença de grandes concentrações de sulfuretos, metano, dióxido de carbono e metais. Paradoxalmente, a vida nas fontes hidrotermais apresenta grande produtividade e por isso elas constituem um meio único para estudar os efeitos adaptativos a longo prazo ao stress ambiental. O objetivo deste estudo foi comparar as respostas de alguns biomarcadores de exposição metálica entre duas espécies hidrotermais, o mexilhão *Bathymodiolus azoricus* e o peixe quimera *Hydrolagus pallidus* do campo hidrotermal Lucky Strike. Os resultados mostraram que o mexilhão *B. azoricus* apresenta valores elevados de metais quando comparados com espécies costeiras aparentadas, especialmente para Ag, Cd, Cu e Zn nas brânquias. No entanto, os níveis de metalotionina (MT) foram surpreendentemente baixo tendo em conta a acumulação metálica observada. A quimera *H. pallidus* também apresentou níveis de metais significativamente superiores nas brânquias em comparação ao músculo, no entanto, os valores de MT foram duas vezes superiores no músculo. A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos mexilhões foi significativamente superior nas brânquias, enquanto as glutatonas peroxidases (GPx) foram mais importantes no manto, o que sugere que os dois tecidos apresentam diferentes estratégias antioxidantes para lidar com fatores de stress. A peroxidação lipídica (LPO) foi mais evidente nas brânquias, indicando que os mecanismos de defesa nesse tecido podem não ser completamente eficazes contra a toxicidade metálica. Apesar de a principal fonte de alimento de *H. pallidus* serem mexilhões com elevados níveis de metais, não se encontraram evidências de bioamplificação de metais. As quimeras poderão apresentar outros mecanismos de desintoxicação mais importantes que as MT.

Palavras-chave: *Bathymodiolus azoricus*, *Hydrolagus pallidus*, metalotioninas, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica.

*Corresponding authors: M.J. Bebianno, e-mail: mbebian@ualg.pt, and Rui Company, e-mail: rcompany@ualg.pt.

INTRODUCTION

Hydrothermal vents were discovered in 1977 and since then researches were conducted to understand how organisms could survive in a very extreme environment, near vent chimneys that emanate hot, acidic and anoxic fluids, extremely enriched with metals and hydrogen sulphide that would normally be toxic in such amounts and combinations (Sarradin *et al.*, 1998). In this context, hydrothermal vents were lately thought that could be used as a possible natural pollution laboratory (Prusky & Dixon, 2002). *Bathymodiolus azoricus* is one of the most abundant species in Mid-Atlantic Ridge vents (Desbruyères *et al.*, 2000) and *Hydrolagus pallidus* is a deep-sea fish found near hydrothermal environments that feeds mainly on vent mussels (Marques & Porteiro, 2000).

Metals are known to produce deleterious effects in marine organisms at high concentrations, including the production of reactive oxygen species responsible for oxidative cellular damage (Stohs & Bagchi, 1995). Organisms developed several detoxification mechanisms to deal with metal contamination including the synthesis of metallothioneins (MT) and antioxidant enzymes. MT is a low-molecular-weight protein with high sulfhydryl content and high affinity for groups IB and IIB metal ions, thereby playing an essential role in cellular processes of metal handling and detoxification. These proteins are induced by heavy metals but also by different chemicals and stressors, in particular by oxidants (Bauman *et al.*, 1991). Antioxidant enzymes include the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidases (GPx) (Fridovich, 1978). Lipid peroxidation (LPO) is an important feature in cellular injury, resulting from free radical reactions in biological membranes (Chesseman, 1982). Transition metals might stimulate LPO (Halliwell & Gutteridge, 1984).

The aim of this study was to determine the concentrations of Ag, Cu, Cd, Fe, Mn and Zn in *B. azoricus* and *H. pallidus* from Lucky Strike and some detoxification mechanisms such as metallothioneins (MT) in the gills and mantle of mussels and the gills and muscle of chimaeras. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation (LPO) were only studied in mussels.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection and preservation

Both mussels (*Bathymodiolus azoricus*, n = 10) and fishes (*Hydrolagus pallidus*, n = 6) were collected in the Lucky Strike hydrothermal vent area (37°17'N – 32°16'W; 1580-1711 m deep) during the Ventox project in summer 2001. Mussels were collected using a remote operated vehicle during the ATOS cruise on board of the research vessel Atalante (IFREMER – French Research Institute for Exploitation of the Sea). Living organisms were immediately dissected and the gills and mantle were deep frozen in liquid nitrogen until analysis. Fishes were captured using baited bottom long-line during VENTACO cruise on board of the research vessel Arquipelago (Department of Oceanography

and Fisheries – University of Azores). The fishes were already dead on arrival, which unable to determine antioxidant enzyme activities due to their fast degradation, and the gills and muscle were dissected and frozen in liquid nitrogen until analysis.

Metal analysis

The concentration of Ag, Cd, Cu, Fe, Mn and Zn were determined in both tissues of *B. azoricus* and *H. pallidus* by ET-AAS (Electrothermal atomic absorption spectrometry) or F-AAS (Flame atomic absorption spectrometry) or ICP-AES (Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry). Metal concentrations were expressed as $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight tissue.

Biochemical analysis

MT concentrations in both tissues of mussels and fishes were determined in the heat-treated cytosol by differential pulse polarography in accordance with the method of Thompson & Cosson (1984) and Bebianno & Langston (1989). MT levels were expressed as mg g^{-1} wet weight.

Antioxidant enzyme activities were only determined in the gills and mantle of *B. azoricus* since the tissues of *H. pallidus* were collected post mortem and consequently the activity of these enzymes had ceased. Superoxide dismutase (SOD – EC 1.15.1.1), catalase (CAT – EC 1.11.1.6) and glutathione peroxidases (GPx) including total-GPx and selenium dependent-GPx (Se-Gpx – EC 1.11.1.9) were determined by spectrophotometric assays at different wavelengths described by McCord & Fridovich (1969), Greenwald (1985) and Lawrence & Burk (1976) respectively. SOD activity was expressed as U mg^{-1} of total protein concentrations (one unit of SOD is the amount of the enzyme that inhibits by 50% the reduction of cytochrome c by the xanthine oxidase/hypoxanthine system at a wavelength of 550 nm), CAT as $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of total protein concentrations and GPx as $\text{nmoles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of total protein concentrations.

Lipid peroxidation was also determined only in the gills and mantle of *B. azoricus* by the method described in Erdelmeier *et al.* (1998) designed to evaluate malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4-HNE). Lipid peroxidation was expressed as nmoles of MDA and 4-HNE g^{-1} of total protein concentrations.

Total protein concentrations were determined in the gills and mantle of *B. azoricus* and gills and muscle of *H. pallidus* by the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) using BSA (bovin serum albumin) as reference standard. Protein concentrations are expressed as mg g^{-1} wet weight tissue.

RESULTS AND DISCUSSION

The hydrothermal vent mussel *B. azoricus* shows a great capacity to accumulate metals within their tissues (Table 1). The levels of all metals are considerably higher than those found in coastal mussels like *M. edulis* or *M. galloprovincialis*, what strongly reflects the long-term exposure to high metal concentrations from hydrothermal vent fluids. The metal levels

in *B. azoricus* are significantly higher in the gills compared to the mantle, especially for Ag, Cd, Cu and Zn concentrations ($p < 0.05$). This can be associated to differences in metal uptake routes and specific physiologic functions. In bivalves the metal uptake is mostly done via the gills, as dissolved ions, and via the digestive tract as particles phagocytosed by the digestive gland. Additionally, the mantle acts as reserve storage and secretion of the shell (Fiala-Medioni *et al.*, 2000).

The metal levels observed in *H. pallidus* (Table 1) were significantly lower compared to those found in *B. azoricus* ($p < 0.05$). Although these fishes depend on hydrothermal vent fauna for food supply, and therefore are frequently found near hydrothermal vents, they have been also captured in non-vent areas (Marques & Porteiro, 2000). This should reduce substantially the exposure time to metals from the vent fluids, comparatively to vent mussels that depend on hydrothermal emissions to maintain the intracellular symbiotic bacteria (both sulphur and methanotrophic) in their gills, which autotrophically synthesize organic matter directly in this tissue and therefore these mussels are continually exposed to the high metal concentration fluids (Southward *et al.*, 2001).

As observed for *B. azoricus*, also in *H. pallidus* the concentrations of most metals (Ag, Cd, Cu and Mn) were significantly higher in the gills, except for Fe (no significant differences between tissues were observed) and Zn (this metal was significantly higher in the muscle) ($p < 0.05$). This would suggest that chimaera fishes accumulate metals mainly during respiration and these metals are accumulated in the muscle in less extent. Moreover, no evidences of metal bioamplification from mussels to fishes were found.

The MT concentrations in vent mussels (Table 1) were 2-fold higher in the gills ($4.6 \pm 1.0 \text{ mg g}^{-1} \text{ w.w.}$) compared to the mantle ($2.1 \pm 0.6 \text{ mg g}^{-1} \text{ w.w.}$) ($p < 0.05$). However, higher levels of these proteins would be expected, taking into account the metal accumulation data. Furthermore, MT concentrations

in the tissues of *B. azoricus* are close to those reported to their coastal counterparts, exposed to lower metal levels in their environment. This suggests that MT in these molluscs might not be the main detoxification mechanism (Rousse *et al.*, 1998).

Contrarily, in *H. pallidus* MT levels were significantly higher in the muscle ($0.27 \pm 0.08 \text{ mg g}^{-1} \text{ w.w.}$) where lower metal concentrations were found, compared to the gills ($0.15 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1} \text{ w.w.}$) ($p < 0.05$). These findings were surprising since these proteins are generally associated with the metal detoxification and in this case did not followed the metal accumulation patterns observed in the two tissues, suggesting that, as hypothesized for *B. azoricus*, MT may not be the most important metal detoxification mechanism in chimaera fishes.

Stress related biomarkers were also evaluated in the tissues of *B. azoricus* (Table 2). Generally, the antioxidant enzymatic activities found in this vent mussel are close to those reported for the coastal mussel *M. galloprovincialis* from Ria Formosa lagoon (data not shown). This is surprising as higher levels of antioxidant enzymes would be expected in *B. azoricus* exposed to a great variety of toxic compounds known to enhance reactive oxygen species production from hydrothermal fluids. SOD and CAT activities were significantly higher in the gills, while the activity of both total and Se-GPx was higher in mantle tissue ($p < 0.05$).

The gills may be more susceptible to oxidative stress, as lipid peroxidation was 2-fold higher in this tissue ($187 \pm 13 \text{ nmol g}^{-1} \text{ total proteins}$) compared to the mantle ($99 \pm 10 \text{ nmol g}^{-1} \text{ total proteins}$).

CONCLUSIONS

B. azoricus accumulate higher metal concentrations than coastal mussels and chimaera fishes suggesting a long-term exposure to metal rich hydrothermal fluids. The gills are the main target tissue for metal accumulation.

Table 1 — Metal ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ d.w.}$) and MT concentrations ($\text{mg g}^{-1} \text{ prot}$) in *B. azoricus* and *H. pallidus* from Lucky Strike hydrothermal field. Data are expressed as means \pm standard error.

Species	Tissues	Ag	Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	MT
<i>B. azoricus</i>	Gills	5.2 ± 1.2	47.2 ± 10.0	79.7 ± 19.4	303 ± 63	7.6 ± 1.9	1976 ± 570	4.6 ± 1.0
	Mantle	0.8 ± 0.2	2.9 ± 1.0	14.2 ± 3.5	235 ± 61	5.8 ± 1.5	124 ± 37	2.1 ± 0.6
<i>H. pallidus</i>	Gills	0.6 ± 0.02	0.37 ± 0.1	4.7 ± 0.9	185 ± 43	5.7 ± 1.3	172 ± 48	0.15 ± 0.02
	Muscle	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.01	1.1 ± 0.3	168 ± 48	2.8 ± 1.0	252 ± 101	0.27 ± 0.08

Table 2 — Activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in the hydrothermal mussel *B. azoricus*.

Tissues	SOD	CAT	Total GPx	Se-GPx	LPO
	($\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$)	($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ prot}$)	($\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot}$)	($\text{nmol mg}^{-1} \text{ prot}$)	($\text{nmol g}^{-1} \text{ prot}$)
Gills	19.1 ± 2.9	17.5 ± 4.9	8.7 ± 1.8	6.8 ± 1.1	187 ± 13
Mantle	14.4 ± 1.6	6.0 ± 1.3	18.5 ± 3.2	15.6 ± 2.1	99 ± 10

Despite the metal concentration antioxidant enzymatic defences are close to those reported in coastal mussels, suggesting a controlled production of ROS in such toxic environment.

MT levels in these mussels are also low, suggesting these proteins are not the major metal detoxification mechanism.

H. pallidus have significantly lower metal levels than the mussels reflecting smaller exposure to hydrothermal fluids and showing no evidences of metal bioamplification.

Like mussels, chimaera fishes accumulate considerably more metals in the gills.

MT, on the other hand, are significantly higher in the muscle tissue not reflecting the metal contamination.

Acknowledgements — The authors are grateful to Pierre Marie Sarradin (IFREMER), chief scientist during ATOS cruise, Afonso Marques chief scientist during VENTACO cruise and David Dixon, Ventox Project coordinator. We wish to express our thanks to the captain and crews of the research vessels Atalante and Arquipelago, ROV-Victor team, director and staff of IMAR DOP (University of Azores). This study was supported by an FCT Ph.D. Grant (SFRH/904/2000) and the European Project VENTOX (EVK3 CT1999-00003).

REFERENCES

- BAUMAN, J. W., LIU, J., LIU, Y. P. & KLAASSEN, C. D., 1991, Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 110: 347-354.
- BEBIANNI, M. J. & LANGSTON, W. J., 1989, Quantification of metallothioneins in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Port. Electrochim. Acta.*, 7: 511-523.
- CHESSEMAN, K. M., 1982, Effects of scavengers and inhibitors on lipid peroxidation in rat liver microsomes. In: D. C. MacBrien & T. F. Slater (eds.), *Free radicals, lipid peroxidation and cancer*. Academic Press, New York.
- DESBRUYÈRES, D., ALMEIDA, A., BISCOITO, M., COMTET, T., KHRIPOUNOFF, N. LE BRIS, N., SARRADIN, P. M. & SEGONZAC, M., 2000, *Hydrobiologia*, 440: 201-216.
- ERDELMEIER, I., GERARD-MONNIER, D., YADAN, J. C. & ACUDIÈRE, J., 1998, Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.*, 11: 1184-1194.
- FIALA-MÉDIONI, A., ROUSSE, N., COSSON, R. P., BOULÈGUE, J. & SARRADIN, P. M., 2000, Bioaccumulation and detoxification of heavy metals in *Bathymodiolus azoricus* (Von Cosel *et al.*, 1998) from Azores hydrothermal vents on Mid-Atlantic Ridge. 7th FECS Conference on Chemistry and the Environment, Metal Speciation in the Aquatic Environment, Oporto (Portugal), pp. 30.
- FRIDOVICH, I. A., 1978, The biology of oxygen radicals. *Science*, 201: 875-880.
- GREENWALD, R. A., 1985, *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, M. C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 34: 183-193.
- LAWRENCE, R. A. & BURK, R. F., 1976, Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 952-958.
- LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MARQUES, A. & PORTEIRO, F., 2000, Hydrothermal Vent Mussel *Bathymodiolus* sp. (Mollusca: Mytilidae): Diet Item of *Hydrolagus affinis* (Pisces: Chimaeridae). *Copeia*, (3): 806-807.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I., 1969, Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.*, 244(22): 6049-6055.
- PRUSKY, A. M. & DIXON, D. R., 2002, Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol.*, 57: 127-137.
- ROUSSE, N., BOULEGUE, J., COSSON, R. P. & FIALA-MÉDIONI, A., 1998, Bioaccumulation des métaux chez le mytilidae hydrothermal *Bathymodiolus* sp. De la ride médio-atlantique. *Oceanol. Acta*, 21(4): 597-607.
- SARRADIN, P. M., CAPRAIS, J. C., BRIAND, P., GAILL, F., SHILLITO, B. & DESBRUYÈRES, D., 1998, Chemical and thermal description of the environment of the Genesis hydrothermal vent community (13°N, EPR). *Cahiers de Biologie Marine de Roscoff*, 38: 159-167.
- SOUTHWARD, E. C., GEBRUK, A., KENNEDY, H., SOUTHWARD, A. J. & CHEVALDONNE, P., 2001, Different energy sources for three symbiont-dependent bivalve mollusks at the logachev hydrothermal site (Mid-Atlantic Ridge). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81: 655-661.
- STOHS, S. J. & BAGCHI, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 8(2): 321-336.
- THOMPSON, J. A. J. & COSSON, R. P., 1984, An improved electrochemical method for the quantification of metallothionein in marine organisms. *Mar. Environ. Res.*, 11: 137-152.



Ação de Detergente Doméstico na Biologia Reprodutiva do Camarão de Água Doce *Macrobrachium olfersi*

L. C. MARTINS, R. D. DA ROSA, L. D. RIVERO, E. M. NAZARI & Y. M. R. MÜLLER*

Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, C.P. 476, CEP 88010-970, Florianópolis, Santa Catarina

RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de detergente de uso doméstico na glândula digestiva, no desenvolvimento embrionário e na reprodução de *M. olfersi*. Camarões foram mantidos em dois aquários (21,5 L de água deionizada): o experimental (aquário I) e o controle (aquário II). Uma dose de 0,075% de detergente doméstico foi adicionada ao aquário I, onde os camarões foram monitorados até o 140º dia de exposição. Durante esse tempo, a maturação gonadal foi acompanhada e os ovos foram removidos das fêmeas ovíferas e medidos. O desenvolvimento foi caracterizado através da morfologia externa dos embriões em cada dia de incubação. Fêmeas dos dois aquários foram crioadestesiadas, sendo o hepatopâncreas e ovários dissecados, fixados em Bouin (24 h), incluídos em parafina e seccionados (8 µm). Ambos os órgãos foram corados com HE e o hepatopâncreas, com Hoescht 33258. Os resultados mostram que a região secretora do hepatopâncreas (aquário II) apresenta tubos constituídos por células B secretoras com evidente aparato vacuolar. Os animais expostos ao detergente mostraram decréscimo no número de células B secretoras e significativa redução do aparato vacuolar. No grupo experimental foi observada redução no tempo de desenvolvimento embrionário, de 14 dias no grupo controle para 11 dias no grupo experimental. O volume dos ovos nos estágios de disco-germinal e pós-nauplius final (tanque I) foram de 0,045 e 0,067 mm³, respectivamente. O volume dos ovos do controle foi, nos mesmos estágios embrionários, de 0,044 e 0,075 respectivamente. Estes resultados sugerem que o detergente de uso doméstico tem efeito negativo sobre a performance reprodutiva de *M. olfersi*.

Palavras-chave: *Macrobrachium olfersi*, detergente, reprodução, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Effects of domestic detergents on the reproductive biology of the prawn *Macrobrachium olfersi*

The aim of this study is evaluate the effects of domestic detergents in the digestive gland, embryonic development and in the reproduction of *M. olfersi*. Prawns were maintained in two tanks with 21.5 L of deionized-water: the experimental (tank I) and the control (tank II). One dose of 0.075% of domestic detergent was added to the tank I, and the prawns were monitored on 140th exposure day. During this time, the gonadal maturation was monitored, the eggs were removed from the ovigerous females and measured. Development was characterized through of external morphology of the embryos in each incubation day. Females from the two tanks were cooled and the hepatopancreas and ovaries were dissected and fixed in Bouin (24 h), embedded in paraffin and sectioned (8 µm). Both organs were stained with HE and the hepatopancreas was also stained with Hoescht 33258. The results show that the secretory region of hepatopancreas (tank II) present tubules constituted by B-cells with an evident vacuolar apparatus. The animals exposed to detergent showed a decrease in the number of B-cells and significant reduction of vacuolar apparatus. In the experimental group was observed a reduction in the embryonic development time from 14 days in control group to 11 days in the experimental group. The egg volume of germinal-disk stage and final post-nauplius (tank I) were 0.045 and 0.067 mm³, respectively and the egg volume of the control was, in the same embryonic stages, 0.044 and 0.075 mm³, respectively. These results suggest that the domestic detergent have a negative effect on the reproductive performance of *M. olfersi*.

Key words: *Macrobrachium olfersi*, detergent, reproduction, embryonic development.

*Corresponding author: Yara Maria Rauh Müller, e-mail: yararm@ccb.ufsc.br.

INTRODUÇÃO

Entre os crustáceos da família Palaemonidae, o gênero *Macrobrachium* é o que apresenta a maior distribuição no Brasil (Bond-Buckup & Buckup, 1989), sendo que, das espécies deste gênero descritas para a Ilha de Santa Catarina, *Macrobrachium olfersi*, conhecida popularmente como pitu, destaca-se por habitar corpos de água doce e salobra, por sua representatividade e periodicidade e pela adaptabilidade às condições experimentais, requisitos essenciais ao adequado andamento de estudos de laboratório (Nazari *et al.*, 2003).

De modo geral nos palemonídeos, a visualização dos ovários é facilitada pela transparência da carapaça do cefalotórax, em que é possível acompanhar os estágios de maturação pelas mudanças em sua coloração, tamanho e forma (Arculeo *et al.*, 1995). Além disso, possuem uma câmara incubadora externa, onde os ovos permanecem até a eclosão, e, devido à transparência do córion, é possível caracterizar a morfologia dos embriões durante todo o período de incubação (Müller *et al.*, 2003, 2004).

O processo reprodutivo é controlado por mecanismos endógenos através de hormônios produzidos pelo sistema endócrino-peduncular (Wilder *et al.*, 1994). Contudo, por se tratar de invertebrados aquáticos, estas funções apresentam também forte dependência das variações de fatores exógenos, como temperatura, salinidade e fotoperíodo (Díaz *et al.*, 2003). Outro fator relevante para a reprodução é a alimentação das fêmeas, pois as características do vitelo dependem diretamente da sua dieta, sendo o hepatopâncreas responsável pelo metabolismo dos nutrientes indispensáveis ao processo reprodutivo.

Os organismos aquáticos encontram-se num meio onde estão naturalmente diluídos vários elementos, inclusive poluentes. Normalmente, devido à sua diluição, os efeitos dos poluentes aquáticos não podem ser imediatamente reconhecidos nos organismos, tendo-se dificuldade de compreender maiores implicações no ambiente (Blockwell *et al.*, 1998).

Estudos realizados em nosso laboratório sugerem que detergentes domésticos, freqüentes nos efluentes urbanos, influenciam o repertório comportamental, a reprodução e o desenvolvimento embrionário das espécies nativas de palemonídeos.

Por serem sensíveis às alterações ambientais, os crustáceos são considerados indicadores de contaminação aquática (Rinderhagen *et al.*, 2000), auxiliando em trabalhos que visam a identificar ambientes alterados, com fins de preservação e manutenção do equilíbrio trófico.

Este estudo visa a avaliar o efeito de detergente de uso doméstico sobre a glândula digestiva, o desenvolvimento embrionário e a reprodução de *M. olfersi* coletados em corpos de água doce da Ilha de Santa Catarina, onde é lançada grande parte dos efluentes urbanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Exemplares adultos de *M. olfersi* foram coletados no Parque Municipal da Lagoa do Peri (27°43'S e 48°32'W) – IBAMA nº 10/04. A captura foi realizada com puçá (malha 0,5 cm) passado entre as pedras de fundo e na vegetação submersa, sendo os animais capturados transportados para o laboratório em recipientes com água do local de coleta e aeração constante. Em laboratório foram realizadas a pesagem e a determinação do comprimento total dos exemplares, bem como a sexagem, através da análise dos caracteres sexuais secundários, sendo os indivíduos separados em machos, fêmeas e fêmeas ovígeras.

Foram montados dois aquários (aquário I: experimental; aquário II: controle) nas dimensões de 30 cm × 30 cm × 50 cm, com 21,5 L de água deionizada, sedimento arenoso e pedras para abrigo. A temperatura foi controlada a 24°C (±1°C) e salinidade em 0‰ (Müller *et al.*, 1999). Machos, fêmeas e fêmeas ovígeras foram mantidos com aeração constante e alimentação diária. No aquário I foi adicionado detergente de uso doméstico, na concentração de 0,075%, e o aquário II foi mantido nas mesmas condições, porém sem a adição do detergente.

Os animais foram monitorados diariamente, sendo a maturação ovariana acompanhada macroscopicamente, através da mudança de coloração e do tamanho dos ovários, visualizados devido à transparência da carapaça do cefalotórax.

As fêmeas ovígeras tiveram uma amostra de ovos (n = 50) retirada diariamente, a qual foi submetida à análise morfológica *in vivo* (10X e 40X), para reconhecimento das estruturas embrionárias típicas de cada estágio do desenvolvimento (Müller *et al.*, 2003). Os ovos foram medidos com ocular micrométrica (40X), sendo obtidos os valores (mm) dos eixos (l) longitudinal e (h) transversal, para o cálculo do volume através da fórmula $v = \pi lh^2/6$ (Odinetz-Colart & Rabelo, 1996).

Após 140 dias de exposição, as fêmeas foram crionestesiadas e dissecadas para retirada do hepatopâncreas e ovários, que foram em seguida fixados em Bouin (24 h), sendo posteriormente desidratados em série etanólica crescente, incluídos em parafina e seccionados (8 µm). Ambos os órgãos foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE). O hepatopâncreas foi submetido ainda à técnica de Hoescht 33258 para detecção de sítios apoptóticos, sendo as lâminas imersas em tampão Mc Ilvaine (5 minutos) e transferidas para solução de Hoescht 33258/tampão Mc Ilvaine (1:2000) (12 minutos). Em seguida, foram lavadas em água destilada, montadas com tampão Mc Ilvaine e vedadas com esmalte.

A análise morfométrica dos órgãos foi realizada a partir das medidas do diâmetro das ovogônias, dos ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos, bem como dos vacúolos das células secretoras do hepatopâncreas, através de ocular micrométrica (100X).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia geral do hepatopâncreas dos grupos controle e experimental mostrou-se bastante similar. A estrutura da região medular do órgão, em corte transversal, do grupo experimental não sofreu modificação. Através das técnicas utilizadas, não foi possível observar alterações no número e na microestrutura dos ácinos dos grupos analisados. Contudo, pôde-se constatar redução de 42% no diâmetro dos vacúolos das células B secretoras, presentes nos ácinos dos animais expostos ao detergente. O diâmetro médio dos vacúolos dessas células do grupo controle foi de 27,78 μm , enquanto os do grupo experimental tinham em média 16,14 μm (Tabela 1).

O número de células nos tecidos do hepatopâncreas mostrou-se bastante semelhante entre os dois grupos. Através da técnica de Hoescht não foi possível detectar apoptose das células acinares e das células epiteliais que revestem as paredes dos túbulos dessa glândula. O efeito do detergente sobre a estrutura celular do hepatopâncreas pode ser explicado pelo fato de os camarões se alimentarem no sedimento, onde provavelmente se acumulam grandes quantidades de contami-

nantes (Blockwell *et al.*, 1998), os quais são transferidos diretamente para a glândula digestiva.

A maturação ovariana pôde ser observada de maneira semelhante no aquário experimental e no controle, mostrando que o detergente não afetou a sucessão dos estágios, podendo ser reconhecida a seguinte seqüência de maturação: imaturo, maturação inicial, intermediária e maduro. Através da análise histológica e morfométrica dos ovários maduros observou-se, principalmente, redução no diâmetro dos ovócitos vitelogênicos dos organismos do grupo experimental (Figura 1).

A redução no diâmetro das células germinativas pode estar relacionada à diminuição das células B do hepatopâncreas, uma vez que estas, entre outras funções, são responsáveis pela síntese e secreção de precursores para a formação do vitelo nas células germinativas. O detergente pode ter interferido na atividade das células B secretoras, o que pode ser constatado pela redução do seu aparato vacuolar. Assim, pode ter ocorrido diminuição da produção protéica no hepatopâncreas e, conseqüentemente, redução na disponibilidade desses compostos para as células germinativas, ocasionando redução no seu diâmetro.

Tabela 1 — Diâmetro dos vacúolos das células B secretoras de hepatopâncreas de *M. ofersi* dos grupos controle e experimental.

Grupo	Diâmetro dos vacúolos (μm)			
	Mínimo	Máximo	Média	DP (\pm)
Controle	16,75	46,85	27,78	7,69
Experimental	10,39	23,74	16,14	3,57

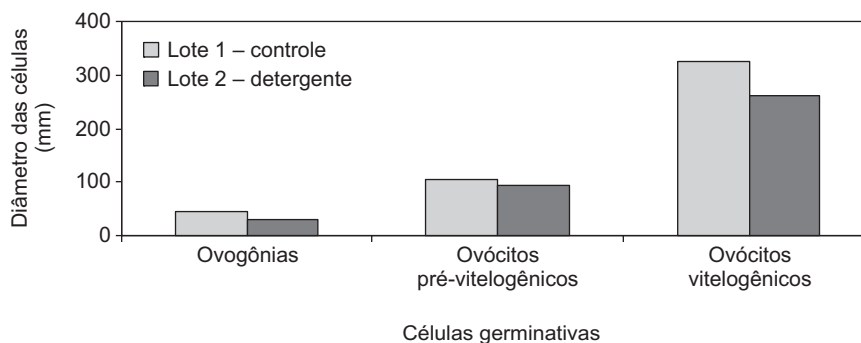


Figura 1 — Valores do diâmetro das células germinativas de ovários de *M. ofersi* dos grupos controle e experimental.

O acompanhamento do desenvolvimento embrionário dos ovos das fêmeas ovígeras dos grupos experimental e controle possibilitou a observação de alterações no tempo de desenvolvimento e na morfologia geral dos embriões. O tempo médio de desenvolvimento embrionário dos ovos do aquário controle foi de 14 dias, corroborando os dados apresentados por Müller *et al.* (2003, 2004). Os ovos expostos ao detergente desenvolveram-se num período menor de 11 dias. Os estágios iniciais de desenvolvimento observados nos dois grupos foram bastante similares, sendo possível observar as estruturas pré-naupliares e naupliares típicas. Contudo, sugere-se que os estágios finais da embriogênese do grupo experimental foram mais acelerados, ocasionando a redução no tempo de desenvolvimento.

Observaram-se anormalidades morfológicas nos ovos e embriões do grupo experimental, sendo constatadas alterações no tamanho, cor e forma dos ovos, bem como na pigmentação do corpo e olhos dos embriões. Anormalidades morfológicas induzidas por compostos inorgânicos foram observadas por Ohta *et al.* (1998) em ovos de *Daphnia magna*, sendo reportadas principalmente malformações de carapaça. Neste mesmo estudo foi constatado que o tempo de desenvolvimento foi mais prolongado nos indivíduos tratados do que no grupo controle.

Na maioria das desovas analisadas notou-se alteração no volume dos ovos, não sendo possível estabelecer um padrão de variação por fêmea. Nos estágios iniciais do desenvolvimento (disco-germinal – E3), a média do volume dos ovos foi semelhante entre o grupo experimental (0,045 mm³) e controle (0,044 mm³). Contudo, nos estágios finais (pós-nauplius final – E11) foram observadas diferenças mais expressivas, com o volume dos ovos dos grupos experimental e controle sendo respectivamente de 0,067 e 0,075 mm³.

Nossos resultados mostram que o detergente influencia o funcionamento dos órgãos analisados, afetando também o desenvolvimento embrionário, evidência da importância dos fatores exógenos na reprodução desses animais. A diminuição da performance reprodutiva tem sido reportada em outros estudos como um efeito subletal de contaminantes em ambientes de água doce (Blockwell *et al.*, 1998). Estudos mostram o uso de palaemonídeos como modelo animal adequado para determinação da toxicidade de metais, agentes químicos e biológicos (Rayburn & Fisher, 1997; Oberdörster *et al.*, 1999; Mariño-Balsa *et al.*, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCULEO, M., PAYEN, G., CUTTITTA, A., GALIOTO, G. & RIGGIO, S., 1995, A survey of ovarian maturation in a population of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda). *Anim. Biol.*, 4: 13-18.
- BOND-BUCKUP, G. & BUCKUP, L., 1989, Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). *Rev. Brasil. Biol.*, 49(4): 883-896.
- BLOCKWELL, S. J., TAYLOR, E. J., JONES, I. & PASCOE, D., 1998, The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 41-47.
- DÍAZ, A. C., SOUSA, L. G., CUARTAS, E. I. & PETRIELLA, A. M., 2003, Growth, molt and survival of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea) under different light-dark conditions. *Iheringia*, 93(3): 249-254.
- MARIÑO-BALSA, J. C., POZA, E., VÁZQUEZ, E. & BEIRAS, R., 2000, Comparative toxicity of dissolved metal to early larval stages of *Palaemon serratus*, *Manja squinaldo*, and *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 345-351.
- MÜLLER, Y. M. R., NAZARI, E. M., AMMAR, D., FERREIRA, E. C., BELTRAME, I. T. & PACHECO, C., 1999, Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratonés, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revta. Bras. Zool.*, 16(3): 629-636.
- MÜLLER, Y. M. R., NAZARI, E. M. & SIMÕES-COSTA, M. S., 2003, Stages in the embryonic development of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 23(4): 670-676.
- MÜLLER, Y. M. R., AMMAR, D. & NAZARI, E. M., 2004, Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Revta. Bras. Zool.*, 21(1): 27-32.
- NAZARI, E. M., SIMÕES-COSTA, M. S., MÜLLER, Y. M. R., AMMAR, D. & DIAS, M., 2003, Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuma* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 23(4): 862-868.
- OBBERDÖRSTER, E., MARTIN, M., IDE, C. F. & MCLACHLAN, J. A., 1999, Benthic community structure and biomarker induction in grass shrimp in an estuarine system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37: 512-518.
- ODINETZ-COLART, H. & RABELO, C., 1996, Variation in the egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Jour. Crust. Biol.*, 16(4): 684-688.
- OHTA, T., TOKISHITA, S., SHIGA, Y., HANAZATO, T. & YAMAGATA, H., 1998, An assay system for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: malformations induced by ethylenethiourea. *Environ. Resear., Section A*, 77: 43-48.
- RAYBURN, J. R. & FISCHER, W. S., 1997, Developmental toxicity of three carrier solvents using embryos of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 33: 217-221.
- RINDERHAGEN, M., RITTERHOFF, J. & ZAUKE, G. P., 2000, Crustaceans as bioindicators. Biomonitoring of polluted water – Reviews and Actual Topics (A. Gerhardt, ed.). Trans Tech Pub Seitech Publications. *Environmental Research Forum*, 9: 1-34.
- WILDER, M. N., OKUMURA, T., SUZUKI, Y., FUSEYANI, N. & AIDA, K., 1994, Vitellogenin production induced by eyestalk ablation in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and trial methyl farnesoate administration. *Zool. Sci.*, 11: 45-53.



SETAC – Brazil

Ação do Acetato de Chumbo sobre o Padrão de Desenvolvimento de Embriões de *Gallus domesticus*

L. B. D. RIVERO, J. C. SCHATZ, M. S. L. CARVALHO,
M. C. DE CARVALHO & Y. M. RAUH MÜLLER*

Mestrado em Neurociências, Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, BEG,
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC

RESUMO

A contaminação causada pelo chumbo tem sua origem principalmente nas emissões atmosféricas, sendo o ar considerado uma das principais vias de transporte e distribuição deste metal pesado no ambiente. A toxicidade do chumbo em embriões e indivíduos jovens é bastante expressiva, podendo comprometer o padrão estrutural e funcional das espécies. Estudos têm demonstrado que em embriões de galinha somente uma exposição ao chumbo, dependendo da dose ingerida, pode resultar em malformações de face e membros, hidrocefalia e redução da taxa de eclosão. O objetivo deste trabalho foi analisar embriões de *Gallus domesticus* expostos ao acetato de chumbo para verificar o comprometimento do padrão embrionário, bem como a ação teratogênica deste metal. Foram realizados estudos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/UFSC, onde 143 embriões de *Gallus domesticus* foram expostos ao acetato de chumbo nas seguintes doses: 150 µg, 250 µg, 350 µg e 450 µg. O grupo controle (n = 47) recebeu 0,1 ml de solução salina nos mesmos dias. Os embriões foram tratados no 3º ou no 5º dia e monitorados durante 6 dias, quando foi avaliada a integridade das estruturas embrionárias. Do total de indivíduos tratados com acetato de chumbo, 27 apresentaram o padrão normal, 34 morreram e 82 apresentaram alteração no padrão de desenvolvimento (retardo de desenvolvimento (3), malformações (14), alterações hemorrágicas (65)). Nossos estudos mostram que nas doses utilizadas o acetato de chumbo modifica o processo de morfogênese, causando alterações morfológicas características, assim, deve haver controle de seu uso e liberação no ambiente.

Palavras-chave: chumbo, toxicidade, desenvolvimento embrionário, *Gallus domesticus*, alterações morfológicas.

ABSTRACT

Lead acetate action in embryonic developmental pattern of *Gallus domesticus*

The contamination for lead has its origin mainly in the atmospheric emissions, being the air considered one of the main ways of transport and distribution of this heavy metal in the environment. Lead toxicity in embryos and young individuals is very expressive, and can commitment the structural and functional pattern of species. Studies have demonstrated that only one exposition to lead in chick embryos, depending on the ingested dose, can result in malformations of face and limbs, hydrocefaly and reduction in the eclosion rate. The objective of this work was analized embryos of *Gallus domesticus* exposed to lead acetate in order to verify the commitment of the embryonic pattern as well as the teratologic actions of the metal. Studies in the Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/UFSC had been carried through, where 143 embryos of *Gallus domesticus* had been exposed to lead acetate in the doses: 150 µg, 250 µg, 350 µg and 450 µg. The control group (n = 47) has received 0.1 ml saline solution in the same days. The embryos had been treated in 3rd or in 5th day, monitorated during six days, when the integrity of the embryonic structures was evaluated. Of the total of individuals treated with lead acetate, 27 presented the normal pattern, 34 died and 82 had altered the developmental pattern

*Corresponding author: Yara Maria Rauh Müller, e-mail: yararm@ccb.ufsc.br.

(developmental delay (3), malformations (14), hemorrhagic alterations (65)). Our studies show that the lead acetate in the doses utilized modified the morphogenesis processes, causing characteristic morphological alterations, awareing to the use and the release of this metal in the environment.

Key words: lead, toxicity, embrionic development, *Gallus domesticus*, morphological alterations.

INTRODUÇÃO

O chumbo é virtualmente onipresente no meio ambiente como resultado de sua ocorrência natural e de sua utilização industrial. Como todo metal pesado, degrada-se lentamente no ambiente, persistindo durante décadas no solo e no leito dos rios, e não é metabolizado pelos animais, ocorrendo o processo de bioacumulação (EPA, 2001). Desde tempos remotos, quando a espécie humana começou a fazer uso das técnicas de metalurgia, a produção desses metais aumentou significativamente e seus efeitos tóxicos geraram problemas permanentes, tanto para seres humanos como para o meio ambiente. O chumbo e seu sulfato são pouco absorvidos e praticamente inócuos, no entanto, os sais solúveis de chumbo, como cloreto, nitrato e acetato, são considerados venenos muito ativos (Cole & Lee, 1997).

O chumbo é uma toxina letal comprovadamente carcinogênica, teratogênica (causa malformações estruturais no feto, baixo peso e/ou disfunções metabólicas e biológicas) e tóxica para o sistema reprodutivo (causa disfunções sexuais, abortos e infertilidade) (EPA, 2001). Estudos comprovam que o chumbo apresenta ação deletéria sobre o desenvolvimento das espécies a ele expostas, tais como ratos (Antônio *et al.*, 1999; Dearth *et al.*, 2002), aves (Narbaitz *et al.*, 1985; Anwer *et al.*, 1988) e humanos (Zaremski *et al.*, 1983; Rothemberg *et al.*, 1999).

Durante o período embrionário, os eventos de proliferação e diferenciação celular e o processo de sinaptogênese são muito intensos, de modo que a intoxicação pelo chumbo nesse período acarretará graves conseqüências ao padrão estrutural e funcional do corpo dos indivíduos (Moreira *et al.*, 2001).

Os embriões de aves e, em especial, o de galinha são utilizados freqüentemente como modelo em embriologia experimental devido ao fato de os ovos serem de fácil manuseio, volumosos e ricos em vitelo, de os embriões desenvolverem-se apenas na região superior do ovo e de o processo ser relativamente curto e poder ser acompanhado diariamente em laboratório, permitindo assim avaliar a ação de agentes exógenos, como o acetato de chumbo, e as alterações induzidas por eles durante o período embrionário. Embriões de galinha expostos ao chumbo e ao zinco no sétimo dia de desenvolvimento e analisados no vigésimo dia apresentavam microftalmia, hidrocefalia e deformidades no bico, membros e tronco (Anwer *et al.*, 1988), e quando expostos apenas ao chumbo, hemorragias intra e extra-embrionárias e necrose cefálica (Narbaitz *et al.*,

1985). O propósito deste estudo foi analisar a ação do acetato de chumbo sobre o desenvolvimento embrionário de *Gallus domesticus* expostos no terceiro e quinto dias e analisados após seis dias, a fim de verificar se esse metal é capaz de comprometer o desenvolvimento normal da espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ovos fertilizados de *Gallus domesticus* foram incubados em estufa (38°C), com a umidade atmosférica sendo mantida por 500 ml de água trocada a cada 3 dias. No terceiro (E3) ou quinto (E5) dia de incubação, em ambiente asséptico, efetuou-se na face mediana do ovo uma abertura de cerca de 1 cm de diâmetro, para observação do embrião e administração do acetato de chumbo (n = 143) nas doses de 150 µg, 250 µg, 350 µg e 450 µg, diluídas em 0,1 ml de solução salina. Com o auxílio de uma agulha hipodérmica, essas doses foram injetadas na vesícula vitelínica, próxima ao embrião, a uma profundidade de até 1,0 mm (Takamatsu & Fujita, 1971). O grupo controle (n = 47) recebeu 0,1 ml de solução salina nos mesmos dias. Após o tratamento, os orifícios foram cobertos com fita adesiva transparente e os ovos recolocados na estufa e observados diariamente durante seis dias. Decorrido esse tempo (E9 e E11, respectivamente), os ovos foram colocados 10 minutos em um refrigerador (4°C) para dessensibilizar os embriões e posteriormente retirados os anexos embrionários para proceder à análise macroscópica e estereoscópica (10X) da integridade das estruturas embrionárias, de acordo com as descrições de Hamburger & Hamilton (1951) e republicação de Sanes (1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise morfológica dos embriões tratados com o acetato de chumbo permitiu caracterizar três grupos distintos:

Grupo 1 – embriões aparentemente normais (Figura 1A).

Grupo 2 – embriões com hemorragias visíveis, caracterizadas por extravasamento sanguíneo nas vesículas cerebrais (hemorragia cefálica) (Figura 1B), hemorragias cefálica e lombar (extensa área de acúmulo de sangue desde as vesículas cerebrais até a região caudal do corpo do embrião) e hemorragia extra-embrionária (localizada na região fora do corpo).

Grupo 3 – embriões com alterações do padrão normal, como extrusão visceral (com órgãos dispostos fora da cavidade abdominal) (Figuras 1D), extrusão cerebral (as vesículas encontram-se de forma desorganizada posicionadas fora da caixa craniana), malformações da face, ciclopia, hidrocefalia e atraso de desenvolvimento (tamanho inferior ao esperado para a idade, primórdio de formação do bico, pele lisa e membros pouco desenvolvidos) (Figura 1C).

Os embriões tratados apenas com salina (controle) apresentaram pequenos focos hemorrágicos, não mostrando, porém, alterações das características morfológicas da espécie (Tabela 1 e Figuras 2 e 3). De acordo com Rodier (1995), o processo de desenvolvimento embrionário está normalmente sujeito a erros; entretanto, a repetição e representatividade das alterações morfológicas e malformações expressam a interferência de um fator exógeno, como o acetato de chumbo, sobre o padrão normal de desenvolvimento da espécie.

De acordo com os nossos resultados (Tabela 1) foram observadas alterações hemorrágicas na região cefálica (HC) ou nas regiões cefálica e lombar (HC + HL) tanto em indivíduos tratados com acetato de chumbo quanto nos indivíduos controle. Contudo, o número de indivíduos que apresentaram estas alterações é significativamente maior nos grupos tratados, o que mostra a interferência do acetato de chumbo sobre a morfogênese embrionária. Narbaitz *et al.* (1985) administraram uma única dose de nitrato de chumbo na câmara de ar de ovos de galinha no décimo dia de incubação e observaram, vinte e quatro horas depois, pequenos e múltiplos focos de hemorragia intra e extra-embrionária na maioria dos embriões analisados, evidenciando que alterações hemorrágicas são características

da ação do chumbo, independente da dose utilizada e da idade embrionária avaliada.

Quanto ao padrão de desenvolvimento, os animais tratados no terceiro dia com 350 µg de acetato de chumbo foram os que apresentaram maior alteração do padrão (25%), quando comparados aos demais grupos (Tabela 1). Considerando que Anwer *et al.* (1988) afirmam que 50 µg de chumbo injetado em E7 são suficientes para causar grande comprometimento das estruturas embrionárias, nas concentrações utilizadas em nossos estudos seria esperada a ocorrência de malformações. De acordo com Pérez-Coll *et al.* (1988), embriões de anfíbio *Bufo arenarum*, submetidos a diferentes concentrações de nitrato de chumbo (0,12 a 32 µg/L), apresentaram alta incidência de alterações morfológicas (neurulação parcial, atraso do desenvolvimento e microcefalia), principalmente os embriões tratados nas concentrações abaixo de 1 µg/L. Nas concentrações mais altas houve aumento gradual da teratogênese e letalidade.

Nossos resultados, como os dos autores citados, demonstraram que *Gallus domesticus*, nos estágios precoces de desenvolvimento embrionário, são muito suscetíveis à exposição a agentes tóxicos. O acetato de chumbo, nas doses utilizadas, pode ser caracterizado como um agente teratogênico multipotente, capaz de alterar o desenvolvimento embrionário normal – interferindo nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos e causando efeitos adversos, como atraso no desenvolvimento, alterações no padrão do sistema nervoso e malformações –, podendo inclusive levar à morte. Este estudo alerta para a necessidade de maior conscientização a respeito do uso e da liberação de poluentes dessa natureza no meio ambiente.

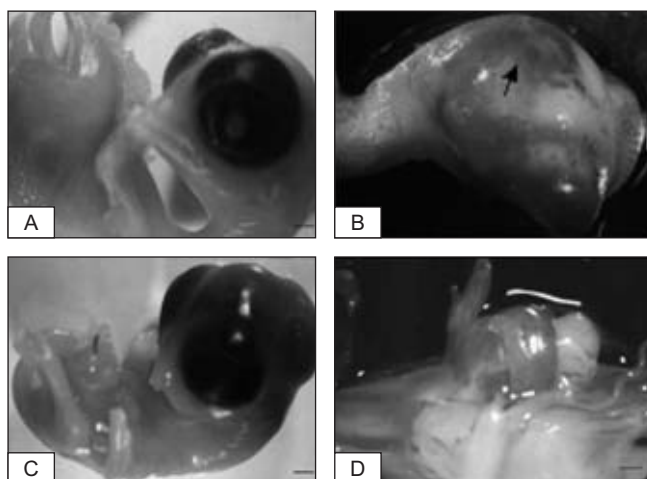


Figura 1 — Embriões de *Gallus domesticus*. A: E9 – controle, padrão normal de desenvolvimento; B: E9 – 150 µg, alterações hemorrágicas; C: E9 – 250 µg, atraso do desenvolvimento; e D: E9 – 350 µg, extrusão visceral. Escala – 0,769 cm.

Tabela 1 — Análise comparativa dos embriões de *Gallus domesticus* submetidos a diferentes doses de acetato de chumbo e indivíduos controle.*

Embrões	Acetato de chumbo (µg)								Controle	
	150		250		350		450		E9	E11
	E9 (N = 21)	E11 (N = 20)	E9 (N = 17)	E11 (N = 17)	E9 (N = 16)	E11 (N = 17)	E9 (N = 20)	E11 (N = 20)	(N = 23)	(N = 24)
AP	23,8%	20%	17,6%		25%		20%	10%		
HC	47,6%	50%	35,3%		37,5%		50%	50%	13%	12,5%
HC + L				23,5%		17,6%		20%		4,2%
HE						11,8%				
Normal	14,3%	10%	17,6%	47,1%	12,5%	41,2%	10%		43,5%	41,6%
Morte	14,3%	20%	29,4%	29,4%	25%	29,4%	20%	20%	43,5%	41,6%

2. AP = alterações do padrão normal, HC = hemorragia cefálica, HC + L = hemorragia cefálica + lombar, HE = hemorragia extra-embriónica.

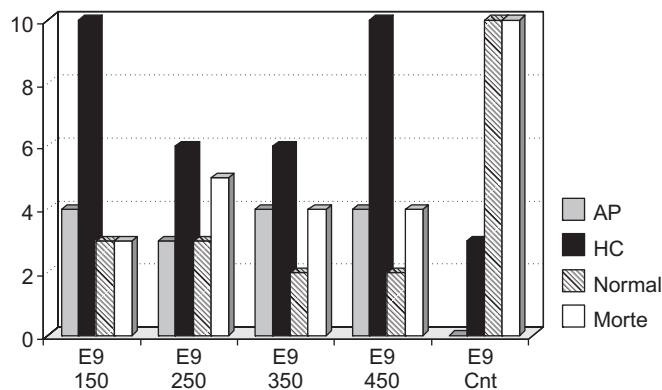


Figura 2 — Análise morfológica dos embriões tratados com acetato de chumbo em E3 com as diferentes doses e analisados em E9. Alteração do padrão (AP), hemorragia cefálica (HC).

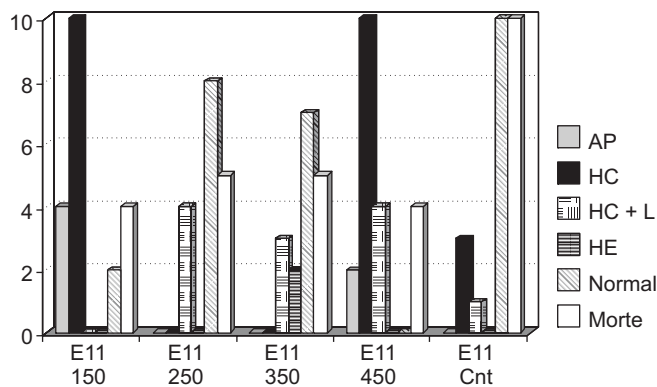


Figura 3 — Análise morfológica dos embriões tratados com acetato de chumbo em E5 com as diferentes doses e analisados em E11. Alteração do padrão (AP), hemorragia cefálica (HC), hemorragia cefálica + lombar (HC + L), hemorragia extra-embriónica (HE).

Agradecimentos — Empresa Macedo, Koerich S/A, São José/SC, pela doação dos ovos utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTÔNIO, M. T., CORPAS, I. & LERET, M. T., 1999, Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol. Letters*, 104: 1-9.
- ANWER, J., ALI, S. & MEHROTRA, N. K., 1988, Antagonistic effect of zinc in lead treated developing chick embryos. *Drug Chem. Toxicol.*, 11(1): 85-95.
- COLE, G. J. & LEE, J., 1997, Immunocytochemical localization of a novel radial glial intermediate filament protein. *Develop. Brain Res.*, 101(1-2): 225-238.
- DEARTH, R. K., HINEY, J. K., SRIVASTAVA, V., BURDICK, S. B., BRATTON, G. R. & DEES, W. L., 2002, Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. *Reproduc. Toxicol.*, 16: 343-352.
- DIAS, P. F. & MÜLLER, Y. M. R., 1999, Ação da insulina na morfogênese de embriões de *Gallus domesticus*. *Rev. Brasil. Biol.*, 59(2): 343-350.
- EPA-U.S., 2001, *Alternative technologies for surface finishing: clear technologies for printed wiring board manufacturers*. Environmental Protection Agency. Disponível em: http://www.epa.gov/dfe/pubs/pwb/tech_rep/Surface_Finishing.pdf.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H., 1951, A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphology*, 88: 49-92.
- KARNOFSKY, D. A. & RIDGWAY, L. P., 1952, Production of injury to the central nervous system of the chick embryo by lead salts. *J. Pharmacology*, 104: 176-186.
- MOREIRA, E. G., VASSILIEFF, I. & VASSILIEFF, V. S., 2001, *Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term*. *Neurotoxicol. and Teratol.*, 23: 489-498.
- NARBAITZ, R., MARINO, I. & SARKAR, K., 1985, Lead-induced early lesions in the brain of chick embryo. *Teratol.*, 32: 389-396.
- PÉREZ-COLL, C. S., HERKOVITS, J. & SALIBIAN, A., 1988, Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*. *Bulletin Environ. Contaminant Toxicol.*, 41: 247-252.
- RODIER, P. M., 1995, Developing brain as a target of toxicology. *Env. H. Perspectives*, 18-19: 73-75.
- ROTHERBERG, S. J., MANOLO, M., JIANG, J., KHAN, F., CUELLAR, R., REYES, S., SANCHEZ, M., REYNOSO, B., AGUILAR, A., DIAS, M., ACOSTA, S., JÁUREGUI, M. & JOHNSON, C., 1999, Maternal blood lead level during pregnancy in South Central Los Angeles. *Arch. Environ. Health*, 54(3): 151-157.
- SANES, J. R., 1992, On the republication of de Hamburger-Hamilton stages series. *Dev. Dyn.*, 195: 229-230.
15. TAKAMATSU, T. & FUJITA, S., 1971, Growth of notochord and formation of cranial and mesencephalic flexures in culture of chick embryo fibroblasts infected with newcastle disease Virus. *J. Antibiotics*, 24: 785-794.
- ZAREMBSKI, P. M., GRIFFITHS, P. D., WALKER, J. & GOODALL, H. B., 1983, Lead in neonates and mothers. *Clin. Chim. Acta*, 134: 35-49.



SETAC – Brazil

Atividade de Acetilcolinesterase em *Daphnia*: Um Bom Biomarcador de Avaliação Ambiental?

L. B. PRINTES^{1*} & A. CALLAGHAN²

¹Cientistas Associados Ltda., Rua Alfredo Lopes, 1717, Vila Elisabeth, CEP 13560-460, São Carlos, SP

²School of Animal & Microbial Sciences, The University of Reading, Whiteknights P.O. Box 228, Reading, RG6 6AJ, UK

RESUMO

A atividade de acetilcolinesterase (AChE) tem sido empregada como um biomarcador de contaminação ambiental. Contudo, em relação aos invertebrados, são necessários estudos adicionais para determinar o papel desta resposta no monitoramento biológico. Sendo assim, foram realizados experimentos para avaliar a interferência de fatores ambientais e de desenvolvimento na atividade de AChE em *D. magna* e *D. similis*. Foram também investigadas as relações entre atividade de AChE, toxicidade aguda e efeitos em nível de população em *D. magna*. Uma relação inversa entre o comprimento do corpo e a atividade de AChE foi verificada para *D. magna*. Neonatas de *D. similis* (= 72 h) mantidas em água mineral diluída tiveram atividade mais baixa de AChE do que as mantidas em meio ASTM. Os resultados obtidos indicaram ainda que as associações entre atividade de AChE e efeitos em níveis mais altos de organização biológica em *D. magna* nem sempre são diretas. As razões entre EC50 e IC50 após exposição aos inseticidas propoxur, paration, malation, clorpirifós e acefato variaram de 0,31 a 0,90. Em organismos previamente expostos ao acefato foram verificadas ainda interferência do genótipo com a conexão entre efeitos sob a atividade de AChE e alterações na taxa de crescimento populacional. Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização da atividade de AChE em dafnínídeos como um biomarcador em programas de análise ambiental deve ser feita com cautela. Por um lado, esta é uma ferramenta sensível que sob condições padronizadas pode dar uma boa indicação de exposição a organofosforados e carbamatos. Por outro, a utilização desta ferramenta para antecipar efeitos em níveis mais altos de organização biológica é limitada e deve ser feita somente em conjunção com análises complementares.

Palavras-chave: colinesterases, *Daphnia*, pesticidas, toxicidade aguda, crescimento populacional.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase activity in *Daphnia*: is it a good biomarker of environmental contamination?

Acetylcholinesterase (AChE) activity has been employed as a biomarker of environmental contamination. However, for invertebrates, additional studies are required to determine the role of AChE activity in biological monitoring. Thus, a series of experiments was performed to evaluate the interference of developmental and environmental factors on AChE activity in *D. magna* and *D. similis*. In addition, the relationships between AChE activity, acute toxicity and population level effects were evaluated for *D. magna*. An inverse relationship between body length and AChE activity has been demonstrated for *D. magna*. Also, juveniles of *D. similis* (= 72 h) kept in diluted mineral water had lower AChE activity than those kept in ASTM water. Our findings have as well indicated that the associations between AChE activity and higher level effects in *D. magna* are not always straightforward. Exposure to parathion, propoxur, malathion, chlorpyrifos, and acephate resulted in the ratio between EC50 and IC50 varying from 0.31 to 0.90. Furthermore, we found that genotypic variation will interfere with the link between AChE activity and population growth rate in *D. magna* pos-exposed to acephate. Therefore, the use of this biomarker in environmental assessment programmes should be made with caution. On one hand, it is very sensitive, and keeping strict standard conditions it can give a good indication of exposure to organophosphates and carbamates. On the other hand, its use as a predictive tool is limited, and should only be made in association with complementary measurements.

Key words: cholinesterases, *Daphnia*, pesticides, acute toxicity, population growth.

* Corresponding author: Liane Biehl Printes, e-mail: printes_liane@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A medição da atividade de acetilcolinesterase (AChE) tem sido empregada com sucesso para monitorar exposição a pesticidas anticolinesterase (organofosfatos e carbamatos). Para organismos vertebrados, existe correlação direta entre o grau de inibição de acetilcolinesterase e a manifestação de efeitos tóxicos letais e subletais (Walker *et al.*, 2001). Entretanto, avaliações com invertebrados têm demonstrado que relação direta entre mudanças na atividade de AChE e toxicidade nem sempre é verificada (Day & Scott, 1990; Sturm & Hansen, 1999). Estudos envolvendo o microcrustáceo *Daphnia magna* mostram resultados controversos e que investigações adicionais são necessárias (Sturm & Hansen, 1999). Definir a extensão em que a inibição de AChE e a toxicidade estão relacionadas em invertebrados é de caráter essencial para estabelecer o papel deste biomarcador como ferramenta de avaliação ambiental (Lagadic *et al.*, 1994).

Desta forma, este estudo teve por objetivo investigar a influência de fatores ambientais e de desenvolvimento na expressão da atividade de AChE, assim como as relações entre este biomarcador e os efeitos em nível individual e populacional em organismos do gênero *Daphnia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio de acetilcolinesterase

O procedimento para a medição da atividade de acetilcolinesterase foi baseado no ensaio genérico proposto por Ellman *et al.* (1961) adaptado para uso em microplacas (Fisher *et al.*, 2000). Os homogenizados foram preparados com grupos de 10 a 20 indivíduos adultos e jovens, respectivamente (Printes, 2003).

Relação entre atividade de acetilcolinesterase e comprimento do corpo em *D. magna*

Neonatas (< 24 h) de *D. magna* (IRCHA, clone tipo 5) foram cultivadas em meio ASTM (ASTM, 1980) até seis classes de tamanho predeterminadas: 1; 1,5; 2; 2,5; 3; e 3,5 mm. Os organismos foram mantidos individualmente em 50 ml de água de cultivo e alimentados diariamente com *Chlorella vulgaris* e uma suspensão de água destilada contendo fermento biológico Fleishman®. Ao atingirem o tamanho estabelecido, os organismos foram congelados em nitrogênio líquido e preservados a -70°C para posterior avaliação da atividade de AChE.

Influência do meio de cultivo sobre a atividade de AChE em *D. similis*

Neonatas de *D. similis* (< 24 h) foram mantidas sem alimento por 48 h (5: 150 ml) em dois meios de cultura: (1) ASTM e (2) água mineral diluída (DMW) (USEPA, 1991). Os organismos foram então congelados e preservados a -70°C para avaliação da atividade de AChE.

AChE × imobilidade em 48 h

Neonatas de *D. magna* (< 24 h) foram expostas a 5 inseticidas (paration, propoxur, clorpirifós, malation e acefato). As concentrações utilizadas variaram de 2 a 17 µM, 120 a 860 µM, 0,7 a 7 µM, 4 a 24 µM e 55 µM a 1 mM para paration, propoxur, clorpirifós, malation e acefato, respectivamente. Após 48 h, foi verificada a mobilidade dos organismos e os organismos móveis foram congelados para análises de AChE. O efeito na atividade enzimática foi correlacionado com valores de EC50 previamente obtidos em testes de toxicidade convencionais.

Relação entre atividade de AChE e efeito populacional

Dois clones de *D. magna* foram selecionados: (1) IRCHA, clone tipo 5 ou “Standard”, e (2) Clone “Ruth” (Universidade de Sheffield, Inglaterra). Os organismos (15: 1000 ml) foram expostos por 7 dias a concentrações subletais de acefato (5 e 10 mg/L). Após 48 h, parte dos organismos foi congelada para a análise da atividade de AChE. No final dos 7 dias de exposição os indivíduos remanescentes foram transferidos para meio ASTM. Não foi oferecido alimento nas primeiras 48 h, e após esse período os organismos foram mantidos com *C. vulgaris* e suspensão de água destilada com fermento biológico. A taxa de crescimento populacional (PGR) foi calculada ao término de 21 dias (Sibly, 1999), e a relação entre AChE e PGR foi avaliada para os dois clones.

Análises estatísticas

Para a comparação dos tratamentos no experimento com *D. similis* em diferentes meios de cultura foi utilizado o teste “t” com nível de significância de 0,05. Os valores de IC50 foram estimados por análises de regressão não linear (SAS, versão 8.2, Instituto SAS, NC, USA), e os dados obtidos foram comparados utilizando-se teste “t” com nível de significância de 0,05. A relação entre PGR e AChE foi calculada através de análise de regressão múltipla utilizando-se S-Plus 6.1 (Insightful Corp. 2002) (Printes, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de AChE em *D. magna* apresentou relação inversa com o tamanho dos organismos ($F_{1,4} = 24,93$; $r^2 = 0,827$; $p = 0,008$) (Figura 1). De maneira similar, relação inversa entre o comprimento do corpo e a atividade de AChE tem sido demonstrada para peixes (Sturm *et al.*, 1999). A relação do tamanho dos organismos com a atividade de AChE não deve ser ignorada. Se diferentes situações são comparadas, deve-se considerar os fatores que podem afetar o crescimento e, conseqüentemente, gerar um falso efeito na atividade de AChE.

O experimento realizado com *D. similis* de dois meios de culturas apontou para variação significativa na atividade de AChE ($t_4 = 4,24$; $p = 0,013$). Os valores obtidos foram $7,15 \pm 0,60$ e $4,18 \pm 0,35$ µM/L/min/g proteína para ASTM e DMW, respectivamente.

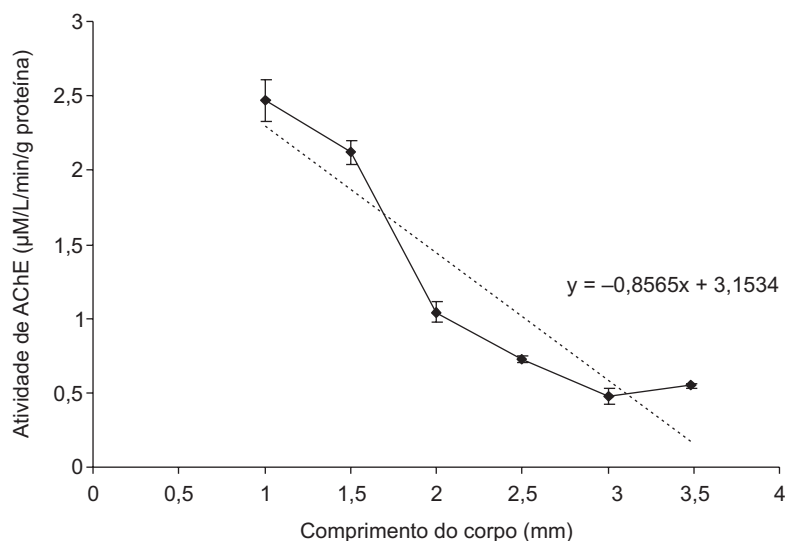


Figura 1 — Relação entre atividade de AChE e comprimento do corpo em *D. magna*.

Outros estudos têm demonstrado que a utilização de meios diferentes para o cultivo e testes de toxicidade com dafnínídeos pode causar variabilidade nas respostas desses organismos a poluentes (Guilhermino *et al.*, 1997).

Os valores de IC50 para clorpirifós e malation foram estatisticamente diferentes ($t_{25} = 6,01$). Não houve diferença significativa entre paration e clorpirifós ($t_{22} = 0,57$) e paration e malation ($t_{25} = 1,39$). Considerando-se a relação entre IC50 e EC50, a razão entre estes dois valores oscilou entre 0,31 e 0,90 (Tabela 1), o que sugere variabilidade nos níveis de AChE associados à toxicidade aguda para os diferentes pesticidas. Sturm & Hansen (1999) também encontraram variação nas relações entre inibição de AChE e imobilidade em *D. magna* e *Chironomus riparius* expostos aos organofosfatos paration e diclorvos.

Essa inconsistência entre as razões IC50/EC50 pode estar refletindo efeitos tóxicos que não estão diretamente re-

lacionados com a inibição de AChE. Os resultados obtidos indicam que o valor de utilizar AChE como um biomarcador de efeito em *D. magna* irá depender do químico avaliado.

A inibição de AChE após 48 h foi associada com um decréscimo em PGR para o clone “Standard”. De maneira inversa, a inibição de AChE foi associada com um aumento em PGR para o clone “Ruth” (Figura 2). Esses resultados sugerem a presença de interação entre genótipo (clone) e ambiente (concentração de acefato) para crescimento populacional em *D. magna*. Esses resultados talvez não sejam surpreendentes, uma vez que variações significativas entre clones de *D. magna* em relação à fecundidade e PGR já foram observadas previamente em organismos expostos a 3,4 dicloroanilina e bromato de sódio (Soares *et al.*, 1992). Vários fatores podem contribuir para estas variações, entre eles diferenças nos mecanismos de defesa utilizados para evitar exposição e variabilidade nos mecanismos de detoxificação (Baird & Barata, 1998).

Tabela 1 — Toxicidade aguda (EC50, 48 h) de diferentes inseticidas para *D. magna* e efeito sobre a atividade de acetilcolinesterase (AChE) (IC50, 48 h). Todas as concentrações em µM exceto para acefato (µM).

Inseticidas	EC50 (48 h)*	IC50 (48 h)**	IC50/EC50
Paration	7,03 (6,38-7,72)	4,19 ± 2,46	0,60
Propoxur	449,90 (370,84-572,43)	256,98 ± 51,00	0,57
Clorpirifós	3,17 (2,62-3,71)	1,40 ± 0,06	0,44
Malation	10,56 (9,99-11,47)	9,48 ± 1,30	0,90
Acefato	309,82 (262,17-370,30)	94,98 ± 5,13	0,31

* EC50 (48 h) = concentração efetiva média de testes de toxicidade padrão (limites de confiança superior e inferior de 95%); ** IC50 = concentração estimada em que a atividade de AChE é inibida em 50% (média para três réplicas ± desvio-padrão).

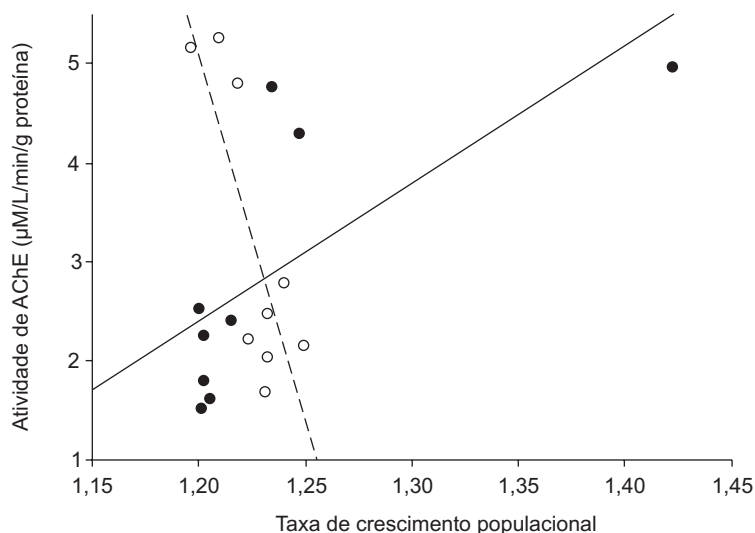


Figura 2 — Relação entre atividade de AChE e taxa de crescimento populacional para *D. magna*; ● clone Standard; ○ clone Ruth.

Além disso, é possível que efeitos secundários associados à toxicidade de organofosfatos também possam contribuir para as diferenças nas respostas individuais e populacionais observadas para os dois clones. Desta forma, a variação genética parece influenciar a relação entre a atividade de AChE e efeitos tóxicos em nível de população para *D. magna*.

Os resultados do presente estudo sugerem que, levando-se em consideração a possibilidade de variações devido a fatores ambientais e de desenvolvimento, a atividade de AChE em *Daphnia* pode ser considerada um bom biomarcador de exposição. Contudo, o uso desse biomarcador como critério para avaliação de efeitos tóxicos em níveis mais altos de organização biológica deve ser feito com cautela. Medidas de análises complementares devem também ser utilizadas.

Agradecimentos — À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTM – American Society for Testing and Materials, 1980, *Standard practice for conducting acute toxicity test with fishes, microinvertebrates and amphibians*. Philadelphia, PA, USA, Report E-790-80.
- BAIRD, D. J. & BARATA, C., 1998, Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: implications for risk assessment. In: V. E. Forbes (ed.), *Genetics and ecotoxicology*. Taylor & Francis, Philadelphia, PA.
- DAY, K. E. & SCOTT, I. M., 1990, Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat Toxicol.*, 18: 101-114.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES JR., V. A. & FEATHERSTONE, R. M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*, 7: 88-95.
- FISHER, T. C., CRANE, M. & CALLAGHAN, A., 2000, An optimized microtitreplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* meigen. *Environ Toxicol Chem.*, 19: 1749-1752.
- GUILHERMINO, L., DIAMANTINO, T. C., RIBEIRO, R., GONÇALVES, F. & SOARES, A. M. V. M., 1997, Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 38: 292-295.
- LAGADIC, L., CAQUET, T. & RAMADE, F., 1994, The role of biomarkers in environmental risk assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3: 193-208.
- PRINTES, L. B., 2003, *The value of acetylcholinesterase in Daphnia as a biomarker of environmental contamination*. Tese de Doutorado, Reading. School of Animal and Microbial Sciences, University of Reading, 238p.
- SIBLY, R. M., 1999, Efficient experimental designs for studying stress and population density in animal populations. *Ecol Appl.*, 9: 496-503.
- SOARES, A. M. V. M., BAIRD, D. J. & CALOW, P., 1992, Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* Straus in chronic bioassays. *Environ Toxicol Chem.*, 11: 1477-1483.
- STURM, A. & HANSEN, P. D., 1999, Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 42: 9-15.
- STURM, A., WOGRAM, J., HANSEN, P. D. & LIESS, M., 1999, Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small stream: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. *Environ Toxicol Chem.*, 18: 194-200.
- USEPA – U.S. Environmental Protection Agency, 1991, *Methods for measuring the acute toxicity of effluent and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4ª Edição. Washington, DC, USA. EPA – 600/4-90/027.
- WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M. & PEAKALL, D. B., 2001, *Principles of ecotoxicology*. London, UK, Taylor & Francis, 309p.



Effects of the *Microcystis aeruginosa* Strain RST9501 from Patos Lagoon, RS, on Growth and Reproduction of the Cladocera *Ceriodaphnia dubia*

N. J. C. MONTEIRO,^{1*} J. S. YUNES² & M. B. BOHRER-MOREL³

¹Laboratório de Ecotoxicologia, CENECO, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

²Unidade de Pesquisas em Cianobactérias, FURG, Rio Grande, RS, Brazil

³Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia Aquática, IPEN, USP, São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

This study evaluates the toxicity of the *Microcystis aeruginosa* strain RST9501, isolated from Patos Lagoon, to cladocerans using standard tests with *Ceriodaphnia dubia*. The strain RST9501 was compared with the non-toxic *M. aeruginosa* strain NPJT-01. Chronic effects were estimated by evaluating reproduction and growth in *C. dubia* exposed to increasing concentrations of *M. aeruginosa*. Alternative food source constituted by *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Artemia* chow was made available for all treatments. The presence of the two strains of *M. aeruginosa* inhibited both reproduction and growth in *C. dubia*. Also, regardless the presence of microcystin, there was an increase in toxicity as the cell concentration of both strains increased.

Key words: *Microcystis*, microcystin, *Ceriodaphnia*, toxicity, Brazil.

RESUMO

Estudos da toxicidade da cepa de *Microcystis aeruginosa* RST9501 da Lagoa dos Patos, RS, sobre *Ceriodaphnia dubia*

Este estudo avalia a toxicidade da cepa RST9501 de *Microcystis aeruginosa*, isolada da Lagoa dos Patos, para Cladocera, através de testes padronizados com *Ceriodaphnia dubia*. Para comparação de seus efeitos foi utilizada a cepa de *M. aeruginosa* NPJT-01 não tóxica para rato. Foi estimado efeito crônico a partir da avaliação da reprodução e crescimento de *C. dubia* em concentrações crescentes de *M. aeruginosa*, sendo que para todos os tratamentos foi disponibilizado alimento alternativo à base de *Pseudokirchneriella subcapitata* mais ração de artêmia. A presença de ambas as cepas de *M. aeruginosa* foi capaz de inibir a reprodução e o crescimento de *C. dubia*, e este efeito foi incrementado com o aumento na concentração de células de ambas as cepas, independente da presença de microcistina.

Palavras-chave: *Microcystis*, microcistina, *Ceriodaphnia*, toxicidade, Brasil.

INTRODUCTION

The production of cyanobacterial toxins in aquatic environments can be extremely harmful to the plankton and to some fish species, and it is associated with a reduction on local diversity of both phytoplanktonic and zooplanktonic populations (Lampert, 1981; Codd, 1985; Paerl, 1988). Consequently, this impact will cause modifications in the behavior, composition and structure of the communities (Fulton & Paerl, 1987; Lampert, 1987; Forsyth *et al.*, 1990; Demott

et al., 1991; Jungmann, 1992; Reinikainen, 1994; Berthon & Brousse, 1995). Despite their low nutritional content, when low concentrations of cyanobacteria are present the inhibition of the filtering rates and the death of individuals of different species may suggest and point out to the high toxicity of certain strains (Nizan *et al.*, 1986; Hanazato & Yasuno, 1987; Gilbert, 1990; Demott *et al.*, 1991).

The aim of this study was to examine how a specific strain of *M. aeruginosa* (RST9501) microcystin containing, isolated in 1995 during investigations in Patos Lagoon (Yunes, 1996),

*Corresponding author: Nade Janara Coimbra, e-mail: nadejanara@ecologia.ufrgs.br.

affect *Ceriodaphnia dubia* growth and reproduction. We hypothesized that growth and reproduction will be only adversely affected when Microcystis microcystin containing is present. To test this hypothesis we mixed the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* with a microcystin-free and a strain of *M. aeruginosa* microcystin containing.

MATERIAL AND METHODS

The strain *M. aeruginosa* RST9501 used in this study was sampled and isolated from the Patos Lagoon estuary, and has been kept under culture conditions in the Cyanobacteria Research Unit, University of Rio Grande, Brazil, since 1995. The strain is well known by its content of 1D-leu MCYST, MCYST-FR, MCYST-LR (Matthiensen, 1999; Matthiensen et al., 2000).

The strain NPJT-01, isolated from the Juturnaíba Dam, Rio de Janeiro, in 1996, and kept in stock conditions in the Laboratory of Ecophysiology and Toxicology of Cyanobacteria (NPPN/UFRJ), is a non-toxic strain to mice and was used to compare the effects when there is no detectable production of microcystin.

Both strains of cyanobacteria were cultured in BGN1/2 medium (Rippka et al., 1979), at 25°C, with constant aeration, photoperiod of 16h/8h (light:darkness) and light intensity of 125 $\mu^3\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

The evaluation of toxins content was performed by using an immunoassay, with the microcystin determination kit "EnviroGard Microcystins Plate Kit[®]" of Strategic Diagnostics Inc, USA. The toxins concentration of the strain RST9501 was determined for different cultures during the entire study period and for all cultures that were used in the toxicity tests. Only two dosages were done for the strain NPJT-01. The detection limit was ≥ 0.1 ppb.

C. dubia were exposed in a static renewal system to different concentrations during a seven-day period. The results were based on survival, growth and reproduction according to the short-term methods for measuring chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms – method 1002.0 of the U.S. Environmental Protection Agency (USEPA, 2002).

Individual organisms were exposed to 30 mL of test solutions at concentrations of 3×10^5 , 6×10^5 , 1.2×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , and 1×10^7 cells.mL⁻¹ of *M. aeruginosa* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. The control and test dilution water used was from a natural well, adjusted to pH 7.2 (± 2), and hardness ranging from 40 to 48 mg.L⁻¹ of CaCO₃.

Growth was evaluated by measuring the total body length of three individuals daily for the entire period of the test. For this purpose, a stereoscopic microscope was used with a micrometered ocular connected to it. The statistic analysis of growth was performed by comparing the means of the differences between final length, taken in the 7th day, and initial length of each individual. The results were analyzed using the Bonferroni's t test (USEPA, 2002).

The reproduction data, represented by the offspring number per female, were analyzed using the Dunnett's multiple comparison test when data were normal and homogeneous, and using Steel's test when they were non-parametric. The normality was verified with the Chi-square and Shapiro-Wilks' tests and the homogeneity of the variance with the Hartley and Bartlett's tests. The Fisher's test was used to evaluate the toxic effects upon the survivorship of the organisms (USEPA, 2002).

RESULTS

The immunoassay analysis results that strain NPJT-01 contains no detectable microcystin, whereas RST9501 presents a microcystin content of 0.56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (2.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ of dry weight⁻¹) with standard deviation 0.14 and coefficient of variation of 24%.

A significant increase in mortality was observed for *C. dubia* treated with microcystin containing strain (RST9501) and microcystin free strain (NPJT-01) at the concentrations of 1×10^7 cells.mL⁻¹, 5×10^6 cells.mL⁻¹, and 2.5×10^6 cells.mL⁻¹ ($p = 0.05$). When reared with *Pseudokirchneriella subcapitata* alone, there was no mortality effect in *C. dubia*.

The presence of both strains of *M. aeruginosa* (toxic and non-toxic) caused a reduction in somatic growth in *C. dubia*. Body length at the end of the experiment was significantly lower as the concentration of cyanobacteria cells increased ($p = 0.05$).

In the treatments fed with microcystin containing RST9501, the difference was significant from the first concentration, 3×10^5 cells.mL⁻¹, with a 17% reduction in growth in comparison with control animals. At the concentrations of 6×10^5 cells.mL⁻¹, 1.2×10^6 cells.mL⁻¹, 2.5×10^6 cells.mL⁻¹, 5×10^6 cells.mL⁻¹, the reduction in somatic growth was 32, 38, 50, and 58%, respectively. For the highest evaluated concentration of this strain, 1×10^7 cells.mL⁻¹, the reduction in mean somatic growth was 70%.

Strain NPJT-01 at 3×10^5 cells.mL⁻¹ increased body length in 7% when compared with the control. A significant reduction in body length was verified from 1.2×10^6 cells.mL⁻¹ (31%) ($p = 0.05$). At 2.5×10^6 cells.mL⁻¹ body length was 41% reduced, and at 5×10^6 cells.mL⁻¹ it was 32% reduced. The maximum reduction in growth obtained with microcystin free NPJT-01 was 51% at 1×10^7 cells.mL⁻¹. When the same test was carried out with *Pseudokirchneriella subcapitata*, none of the concentrations evaluated significantly affected somatic growth. The maximum reduction observed was 12% (Figure 1).

The presence of both strains of *M. aeruginosa* promoted a statistically significant reduction ($p = 0.05$) in *C. dubia* reproduction (Table 1). A decrease in the offspring number was observed as the concentrations of cyanobacteria increased. When the cladocerans were exposed to the same concentrations of *Pseudokirchneriella subcapitata*, the reproduction was not significantly altered in comparison to the control group ($p = 0.05$). However, there was a tendency to stimulating *C. dubia* reproduction with increasing cell concentrations of *Pseudokirchneriella subcapitata*.

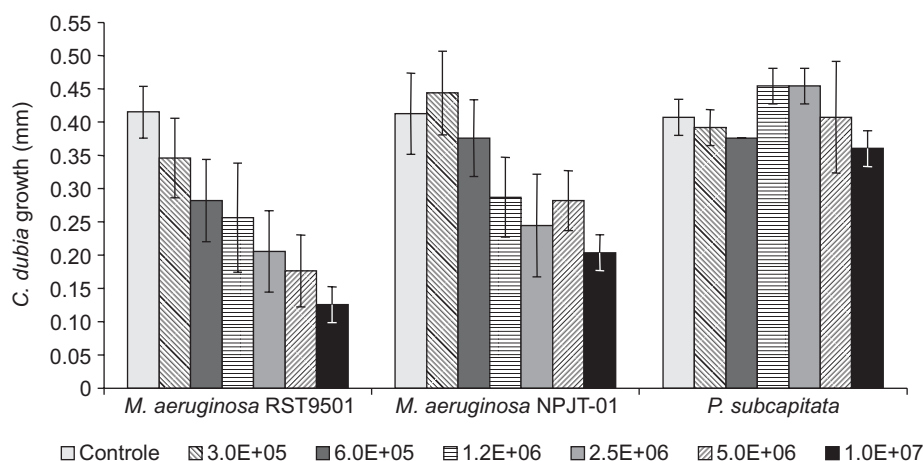


Figure 1 — Difference in size (growth) between the seventh and the first day in *C. dubia* exposed to *Microcystis* toxic strain (RST9501), non-toxic strain (NPJT-01) and *Pseudokirchneriella subcapitata*. Error bars indicate standard deviation.

Table 1 — Statistical results of the *C. dubia* reproduction, comparing the two strains of *Microcystis* (RST9501 and NPJT-01) in different concentrations.

Treatment	<i>Microcystis aeruginosa</i>				<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	
	Strain RST9501		Strain NPJT01		Mean	Standard deviation
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation		
Control	22.85 ^{ab}	6.79	26.15 ^a	7.87	20.30 ^{ab}	6.02
3.0E+05	18.03 ^b	11.19	22.80 ^{ab}	7.04	25.50 ^a	9.34
6.0E+05	13.39 ^{bc}	10.84	17.63 ^b	10.54	24.20 ^{abc}	3.49
1.2E+06	8.94 ^c	10.09	13.95 ^{bc}	9.01	27.00 ^a	5.46
2.5E+06	4.01 ^{cd}	5.78	6.83 ^c	6.73	24.70 ^a	4.45
5.0E+06	1.78 ^d	2.71	3.10 ^{cd}	3.81	32.10 ^a	9.18
1.0E+07	0.15 ^e	0.58	0.63 ^{de}	1.48	28.30 ^a	4.45

a. For the mean values, the letters a, b, c, d, and e indicate distinct significant differences in the analysis of variance complemented by the Dunnett multiple comparison test T3 ($p = 0.05$).

Comparing the two strains of *Microcystis* (RST9501 and NPJT-01), the effect upon *C. dubia* reproduction was not significantly different ($p = 0.05$) (Table 1). When *M. aeruginosa* or *Pseudokirchneriella subcapitata* were utilized as the only food source, a significant difference ($p = 0.05$) in offspring production was observed.

DISCUSSION

Toxin analysis has confirmed the presence of microcystins in RST9501 strain only. The concentration of this strain (1.64 $\mu\text{g.mg}$ of dry weight⁻¹) is well within the range of 0.161 to 4.90

$\mu\text{g.mg}$ of dry weight⁻¹ reported in the literature for different strains (Reinikainen *et al.*, 1994; Yunes *et al.*, 1996; Matthiensen *et al.*, 1999; Ferrão-Filho *et al.*, 2000; Lürling & Van Der Grinten, 2003).

Survival, growth and reproduction of *C. dubia* were significantly reduced when both strains, microcystin containing (RST9501) and microcystin free (NPJT-01), were offered as food. *M. aeruginosa* have been reported to exert strong effects on Cladocera (Lampert, 1981; Fulton & Paerl, 1987; Hanazato & Yasuno, 1987; Gilbert, 1990; Lürling & Van Der Grinten, 2003). Both, increase in growth and delay in reproduction have been reported as chronic effects of *M. aeruginosa* in *Daphnia* (Reinikainen *et al.*, 1999).

The importance of the presence of microcystins for the zooplankton has been widely discussed (Nizan *et al.*, 1986; DeMott *et al.*, 1991; Jungemann, 1992; Lüring & Van Der Grinten, 2003; Reinikainen *et al.*, 1994; Rohrlack *et al.*, 1999a; Rohrlack *et al.*, 1999b). Contrasting with our results, mortality in *Daphnia* has been reported only when microcystins containing cells were present, suggesting microcystin-LR to be the likely cause of toxicity (Rohrlack *et al.*, 1999b).

Nevertheless, according to Reinikainen *et al.* (1994) and Lüring & Van Der Grinten (2003), *M. aeruginosa* toxicity to daphnids could be attributed not only to the microcystin, but also to the possible occurrence of other potentially toxic substances in the algae cells. Lethal effect was observed on *D. pulicaria* when a fraction of *M. aeruginosa* microcystins – free extract was used (Jungmann, 1992). Thus, it was suggested that a highly toxic component, different from microcystin-LR, could have been the cause of the toxicity.

Our findings suggest that a dose-related reduction on survival, growth and reproduction in *C. dubia* exposed to *Microcystis* may be a result of its low nutritional content. This is reinforced by the fact that there was no difference between the two analyzed strains (with or without microcystin) in terms of toxic effects. Cyanobacteria may be poorly digested or assimilated. In addition, it may lack essential unsaturated fat and other essential nutrients for the development of *C. dubia* (Lampert, 1987; DeMott, 1998; DeMott & Müller-Navarra, 1997).

REFERENCES

- BERTHON, J. L. & BROUSSE, S., 1995, Modification of migratory behavior of planktonic Crustacea in the presence of a bloom of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). *Hydrobiologia*, 300/301: 185-193.
- CODD, G. A. & BELL, S. G., 1985, Eutrophication and toxic cyanobacteria in freshwaters. *J. Water Pollut. Control.*, 34: 225-232.
- DEMOTT, W. R. & MÜLLER-NAVARRA, D. C., 1997, The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. *Freshwater Biology*, 38: 649-664.
- DEMOTT, W. R., 1998, Utilization of a cyanobacterium and a phosphorus-deficient greenalga as complementary resources by daphnids. *Ecology*, 79: 2463-2481.
- DE MOTT, W. R., ZHANG, Q. & CARMICHAEL, W. W., 1991, Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 36(7): 1346-1357.
- FERRÃO-FILHO, A., AZEVEDO, S. M. F. O. & DEMOTT, W. R., 2000, Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*, 45: 1-19.
- FORSYTH, D. J., JAMES, M. R. & CRYER, M., 1990, Alteration of seasonal and diel patterns in vertical migration of zooplankton by *Anabaena* and planktivorous fish. *Arch. Hydrobiol.*, 117: 385-404.
- FULTON, R. S. & PAERL, H. W., 1987, Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. *Journal of Plankton Research.*, 9: 837-855.
- GILBERT, J. J., 1990, Differential effects of *Anabaena affinis* on cladocerans and rotifers: mechanisms and implications for zooplankton community structure. *Ecology*, 71: 1727-1740.
- HANAZATO, T. & YASUNO, M., 1987, Evaluation of *Microcystis* as food for zooplankton in a eutrophic lake. *Hydrobiologia*, 144: 251-259.
- JUNGMANN, D., 1992, Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC7806 that are more active against *Daphnia* than two microcystins. *Limnol. Oceanogr.*, 37: 1777-1783.
- LAMPERT, W., 1987, Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21: 483-490.
- LAMPERT, W., 1981, Inhibitory and toxic effects of blue-green algae on *Daphnia*. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, 66: 285-298.
- LÜRLING, M. & VAN DER GRINTEN, E., 2003, Life-history characteristics of *Daphnia* exposed to dissolved microcystin-LR and to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with and without microcystins. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 1281-1287.
- MATTHIENSEN, A., YUNES, J. S. & CODD, G. A., 1999, Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoas dos Patos, RS. *Rev. Brasil. Biol.*, 59(3): 361-376.
- MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K., YUNES, J. S., KAYA, K. & CODD, G. A., 2000, [d-Leu1] Microcystin-LR, from the Cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry*, 55: 383-387.
- NIZAN, S., DIEMENTMAN, C. & SHILO, M., 1986, Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 497-502.
- PAERL, H. W., 1988, Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and island waters. *Limnol. Oceanogr.*, 33: 823-847.
- REINIKAINEN, M., HIETALA, J. & WALLS, M., 1999, Reproductive allocation in *Daphnia* exposed to toxic cyanobacteria. *Journal-of-Plankton-Research.*, 21: 1553-1564.
- REINIKAINEN, M., KETOLA, M. & WALLS, M., 1994, Effects of the concentrations of toxic *Microcystis aeruginosa* and an alternative food on the survival of *Daphnia pulex*. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 424-432.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M. & STANIER, R. Y., 1979, Generic assignments, strain stories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111: 1-61.
- ROHRLACK, T., DITTMANN, E., HENNING, M., BOERNER, T. & KOHL, J. G., 1999a, Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 737-739.
- ROHRLACK, T., HENNING, M. & KOHL, J. G., 1999b, Does the toxic effect of *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata* depend on microcystin ingestion rate? *Archiv fuer Hydrobiologie.*, 146: 385-395.
- USEPA, 2002, *Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. 4. ed. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC., EPA-821-R-02-013.
- YUNES, J. S., SALOMON, P. S., MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K. A., RAGGETT, S. L. & CODD, G. A., 1996, Toxic blooms of Cyanobacteria in the Patos Lagoon estuary, Southern Brazil. *J. Aquat. Ecosystem Health.*, 5: 223-229.